

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
17 juin 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/051271 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

G01N 33/53, 33/543, 33/58

(74) Mandataires : GOULARD, Sophie etc.; CABINET  
ORES, 36, rue de St Petersburg, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/003521

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

28 novembre 2003 (28.11.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0214959 28 novembre 2002 (28.11.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31-33 rue de la Fédération, F-75015 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : VOL-  
LAND, Hervé [FR/FR]; 25, boulevard Dubreuil, F-91400  
Orsay (FR). CREMINON, Christophe [FR/FR]; 30, av-  
enue Saint Laurent, Bâtiment C2, F-91400 ORSAY (FR).  
NEUBURGER, Laure-Marie [FR/FR]; 61, avenue Henri  
Ginoux, F-92120 Montrouge (FR). GRASSI, Jacques  
[FR/FR]; 28, avenue des Tilleuls, F-91440 Bures sur  
Yvette (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR CONTINUOUS DETECTION OF AN ANALYTE, TRIFUNCTIONAL DETECTING REAGENT  
USED AND DETECTING DEVICE

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DÉTECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, RÉACTIF TRIFONCTIONNEL DE DÉTECTION  
MIS EN OEUVRE ET DISPOSITIF DE DÉTECTION.

(57) Abstract: The invention concerns a method for heterogeneous phase detection of an analyte, the trifunctional reagent used for  
implementing said method, its use for detecting an analyte, as well as the device for detecting a corresponding analyte.

(57) Abrégé : La présente Invention est relative à un procédé de détection en phase hétérogène d'un analyte, au réactif trifonctionnel  
de détection mis en uvre au cours de ce procédé, à son utilisation pour la détection d'un analyte, ainsi qu'au dispositif de détection  
d'un analyte correspondant.

WO 2004/051271 A1

## PROCÉDÉ DE DÉTECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, RÉACTIF TRIFONCTIONNEL DE DÉTECTION MIS EN ŒUVRE ET DISPOSITIF DE DÉTECTION

La présente Invention est relative à un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte, au réactif trifonctionnel de détection mis en œuvre au cours de ce procédé, à son utilisation pour la détection d'un analyte, ainsi qu'au dispositif de détection d'un analyte correspondant.

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses techniques permettant la détection d'analytes, et en particulier de molécules dans des conditions de laboratoire. Cependant de plus en plus fréquemment, pour des raisons de santé et de sécurité notamment, il est nécessaire de détecter rapidement la présence de composés qui sont soit des composés d'intérêt (toxines, toxiques chimiques, hormones,...), soit de produits dérivés ou associés avec des molécules d'intérêt, soit de marqueurs d'un événement ou d'une activité particulière (pesticides, métaux lourds, hormones...).

Ces molécules peuvent être présentes dans des milieux très divers tels que l'eau, l'air, la terre, des échantillons biologiques ou bien encore dans des aliments.

Pour une protection et/ou surveillance optimale, la détection de ces molécules doit être effectuée en temps réel et en continu. On entend par dosage en continu un dosage permettant de suivre en permanence la présence ou les modifications de concentration d'une molécule d'intérêt dans un milieu.

Parmi les nombreuses techniques utilisées à ce jour pour détecter ces composés (analytes), un grand nombre utilise la particularité de certaines substances à se lier spécifiquement à ces analytes pour former des complexes. Ces substances que l'on appellera "récepteur", peuvent être de nature très diverse : biologique (anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante (Fab', Fab, scFv), récepteurs, acides polynucléiques (ADN ou ARN), acides peptidonucléiques, lectines, protéines transporteuses) ou chimique (chélates, récepteurs synthétiques). Parmi ces substances, l'anticorps présente la plus large utilisation.

De telles méthodes de détection nécessitent un marquage afin de quantifier ou détecter, par un signal, les complexes formés après réaction entre l'analyte à détecter et le récepteur. Ce marquage peut être porté soit par le récepteur

soit par une substance (B) correspondant à l'analyte ou à un analogue ou à un fragment de l'analyte ; cette molécule marquée étant souvent appelée traceur.

Suivant que la technique nécessite ou non la séparation des complexes formés des substances libres, on distingue deux grands types de détection  
5 dits en phase homogène ou en phase hétérogène.

Les dosages en phase homogène sont réalisés dans un même milieu. Ils sont utilisés lorsque la formation du complexe modifie le signal porté par le récepteur ou la molécule (B) : la formation du complexe peut alors être suivie directement en mesurant le signal. Ces dosages ne nécessitant pas d'étape de  
10 séparation permettent une automatisation plus aisée.

Les dosages en phase hétérogène font intervenir, après réaction entre l'analyte et le récepteur, une étape de séparation du traceur non complexé de celui engagé dans les complexes. Cette séparation est souvent réalisée en employant deux milieux ou phases : par exemple une phase solide et une phase liquide.

15 A partir de ces principes de base, de nombreuses méthodes de dosages ont été décrites, différant notamment selon la nature du marquage utilisé qui peut par exemple être enzymatique, radioactif ou luminescent (Grassi J. *et al*, Handbook of Experimental Pharmacology, Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1987, 87, Chapitre 5 ; Pelizzola D. *et al*, Q J Nucl. Med., 1995, 39(4) 251-263).

20 Parmi ceux-ci, le marquage par un composé luminescent présente l'avantage d'obtenir un signal localisé qui ne nécessite pas la présence d'autres réactifs comme c'est le cas pour les marquages enzymatiques. Ce type de marquage permet également l'utilisation de phénomène tel que le transfert d'énergie qui peut s'effectuer selon différents mécanismes : transfert d'énergie par résonance, transfert d'énergie  
25 radiatif (l'accepteur absorbe la lumière émise par le donneur), transfert d'électron (Matko J. *et al*, Biochemistry, 1992, 31, 703-711 ; Nikoobakht B. *et al*, Photochemistry and Photobiology, 2002, 75, 591-597).

Ce transfert d'énergie, entre un composé "donneur" (D) luminescent et un composé "accepteur" (A) luminescent ou non, et qui est dépendant de la distance  
30 entre A et D, a été utilisé pour la réalisation de nombreux dosages. On choisit D et A, qui sont couplés à l'accepteur ou l'analyte, afin que le transfert d'énergie n'ait lieu que lorsque le complexe récepteur/analyte est formé. Ce phénomène se traduit par une

diminution ou extinction de la luminescence de D et une émission de luminescence de A si celui-ci est luminescent, lorsque D est excité. Lors de ces dosages on mesure soit la variation de la luminescence de A, soit la variation de la luminescence de D ; la nature de A et de D étant variable.

5 C'est ainsi que différents Auteurs ont déjà proposé des méthodes de détection d'un analyte par mesure de la luminescence de A :

- la méthode décrite par exemple par Arai R. *et al.* (Protein Engineering, 2000, 13(5), 369-396) utilise comme donneur et accepteur deux protéines fluorescentes. Ces deux protéines sont produites par biologie moléculaire, chacune formant une protéine chimère avec soit la région variable de la chaîne lourde soit la région variable de la chaîne légère d'un même anticorps. La présence de la molécule contre laquelle est dirigé l'anticorps induit la formation d'un complexe avec les deux protéines chimériques. La distance entre les deux protéines fluorescentes est alors compatible avec un transfert d'énergie, l'excitation de D va donc induire une fluorescence de A qui sera mesurée ;

10

15

- selon la demande internationale WO 96/42016, il est possible d'utiliser comme donneur un complexe de terres rares (europium, terbium) avec un chélate, un cryptate ou un macrocycle et comme accepteur une protéine fluorescente. A et D peuvent être, soit couplés à deux récepteurs pouvant se complexer simultanément sur l'analyte et la présence de ce dernier se traduit alors par une émission de luminescence de A lorsque D est excité, soit A est couplé à un récepteur et D à l'analyte et la présence de l'analyte va induire une compétition avec l'analyte couplé à D pour la complexation avec le récepteur (dosage compétitif), la luminescence de A devenant alors inversement proportionnelle à la quantité de l'analyte ajouté. Ce type de dosage est appelé dosage par luminescence résolue dans le temps.

20

25

D'autres Auteurs ont également proposé des méthodes de détection d'un analyte par mesure de la luminescence de D. Ces dosages utilisent la capacité d'un composé (A) à diminuer ou supprimer la luminescence d'un autre composé (D) lorsque ceux-ci sont suffisamment proches ("Quench"). La gamme de molécules A pouvant être utilisées est donc plus étendue et inclut ainsi des composés non luminescents tels que des métaux lourds, des atomes lourds, des molécules chimiques

30

comme par exemple le rouge de méthyle, des nanoparticules telles que celles vendues sous la dénomination Nanogold® par la société Nanoprobes (USA), ou bien encore les molécules vendues sous les dénominations DABCYL® (Eurogentec, Belgique), QSY Dyes (Molecular Probes Inc., USA), ElleQuencher® (Oswell/Eurogentec) ou Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies Inc., USA).

A titre d'exemples :

- le brevet américain n° 3,996,345 décrit une méthode mettant en œuvre des paires de molécules fluorescente/"Quencher" dans des dosages utilisant des anticorps comme récepteurs ;
- 10       - la méthode proposée par Adamczyk M *et al.* (Organic Letters, 2001, 3, 1797-1800) utilise une protéine bioluminescente (Aequorine®) comme donneur et du QSY-7 ou du DABCYL® comme accepteur ou "Quencher". D est couplée à une molécule de biotine et A à une molécule d'avidine. La formation du complexe biotine/avidine provoque une diminution de la bioluminescence de D, la
- 15       présence de biotine libre ou couplée à une protéine va induire une compétition avec la biotine couplée à D pour la complexation avec l'avidine, la bioluminescence de D sera alors proportionnelle à la quantité de biotine ajoutée ;
- Lee M. *et al.* (J. Agr. Food Chem., 1999, 47, 2766-2770) et Schobel *et al.* (Bioconjugate Chem., 1999, 10, 1107-1114) décrivent l'utilisation de
- 20       deux molécules fluorescentes comme donneur et "Quencheur". Le donneur est couplé à un anticorps et l'accepteur est couplé à l'analyte. Comme précédemment la formation du complexe anticorps-D/analyte-A provoque une diminution de la fluorescence de D, qui est restaurée par la présence de l'analyte dans le milieu ;
- Dubertret B. *et al.* (Nature Biotechnology, 2001, 19, 365-370) et
- 25       Bonnet *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, 96, 6171-6176) décrivent l'utilisation d'un acide polynucléique ("Beacon") qui a la particularité de s'hybrider avec lui-même en se repliant. Selon la méthode décrite dans cet article un composé fluorophore (D) est fixé à l'extrémité 3' de l'acide polynucléique et un accepteur (A : nanoparticule ou DABCYL®) est fixé à l'extrémité 5'. Les deux extrémités du "Beacon" étant proches,
- 30       la fluorescence de D est diminuée par A. La présence d'un acide polynucléique (analyte) pouvant s'hybrider avec une région du "Beacon" va induire une linéarisation

de ce dernier et donc une augmentation de la distance entre D et A, et ainsi diminuer l'atténuation de la fluorescence de D par A ;

- le brevet américain n° 5,279,943 propose une méthode de détection d'un analyte dans laquelle des atomes lourds sont utilisés comme "quenchers" de la luminescence ;

- le brevet américain n° 5,229,302 décrit un procédé de détection d'un analyte dans un milieu dans lequel un composé chimique est couplé à un ligand ou à un analogue de celui-ci qui, lorsque le complexe anticorps/ligand est formé, atténue la fluorescence émise par l'anticorps lors d'une excitation à 280 nm. La présence de l'analyte dans le milieu va induire une compétition pour la complexation avec l'anticorps et ainsi restaurer la fluorescence de l'anticorps ;

- Chen C.T. *et al.* (Science, 1998, 279, 851-852) ont décrit une méthode de détection d'un analyte dans un milieu au moyen d'un récepteur synthétique sur lequel est fixé un fluorophore et un quencher. En absence d'analyte le quencher est suffisamment proche du fluorophore pour diminuer sa fluorescence. La complexation de l'analyte sur le récepteur va augmenter la distance entre le quencher et le fluorophore et ainsi augmenter la fluorescence de ce dernier.

Il est à noter que l'ensemble des dosages utilisant le transfert d'énergie décrits précédemment sont des dosages en phase homogène.

Or, dans le cadre d'une détection en continue d'un analyte, les dosages en flux semblent particulièrement adaptés car ils permettent un apport permanent en échantillon.

C'est ainsi que plusieurs types de dosage en flux ont déjà été décrits :

- plusieurs Auteurs ont notamment proposé des procédés de dosage d'analytes mettant en œuvre un anticorps immobilisé sur les parois d'un capillaire, cet anticorps étant saturé par un analyte marqué ou par un analogue marqué de celui-ci. Le passage de l'analyte dans le capillaire induit une compétition avec l'analyte marqué pour la liaison avec l'anticorps. Ainsi, une certaine quantité de l'analyte marqué va être libérée et détectée en sortie du capillaire (voir notamment les brevets américains n° 5,183,740 et 6,323,041 et Sheikh *et al.* Biosensor & Bioelectronics, 2001, 16, 647-652) ;

- à l'inverse, Barzen C. *et al* (Biosensor & Bioelectronics, 2002, 17, 289-295) ont décrit un procédé de détection d'un analyte dans lequel ils utilisent une phase solide sur laquelle est immobilisé l'analyte ou un analogue de l'analyte à détecter. L'échantillon contenant ou non l'analyte à détecter est préincubé avec un anticorps anti-analyte marqué. Lors du passage de cette solution sur la phase solide, les anticorps non-complexés vont se fixer sur la phase solide *via* l'analyte immobilisé. Ainsi le signal fluorescent mesuré au niveau de la phase solide est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon ;

- Plowman T.E., *et al.* (Anal. Chem., 1999, 71, 4344-4352) ont développé une méthode de dosage permettant de doser simultanément, sur une même phase solide, différents analytes. Selon cette méthode, des anticorps reconnaissant différents analytes sont immobilisés sur une phase solide à des endroits distincts. Une solution, contenant l'échantillon (avec les différents analytes) et différents anticorps anti-analytes marqués à l'aide d'un fluorophore, est déposée sur la phase solide. Enfin, on mesure la fluorescence qui est issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs correspondant aux différents sites d'immobilisation des anticorps. Comme pour le dosage précédent la nécessité de mélanger l'analyte avec un anticorps marqué rend ce procédé difficilement applicable à un dosage en continu car cela impliquerait un apport permanent en réactif ;

- Ligler F.S. *et al.* (Environmental Science & Technology, 1998, 32, 2461-2466) ont développé un biocapteur permettant de détecter des molécules présentes dans l'air. Ce biocapteur est constitué d'une fibre sur laquelle sont couplées des molécules d'avidine. Des anticorps anti-analytes biotinylés sont immobilisés sur cette fibre *via* le complexe avidine/biotine. La détection s'effectue en passant l'échantillon (molécules présentes dans l'air, solubilisées dans un tampon) sur cette fibre puis des anticorps anti-analytes marqués avec un fluorophore. Enfin la fluorescence, issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs, est mesurée. Cependant, les différentes étapes nécessaires à la réalisation de ce procédé et l'apport en anticorps marqués qui devrait être permanent ne permettent pas une réelle détection en continue.

Il ressort donc de la description des différents procédés de détection connus de l'art antérieur, que tous les dosages en flux disponibles à ce jour sont des

dosages en phase hétérogène (phase solide/phase liquide). En effet des dosages en phase homogène en flux nécessiteraient l'apport en continu de récepteurs et/ou d'analytes marqués, ce qui serait coûteux et plus difficile à mettre en œuvre.

Enfin, il a également déjà été proposé, notamment dans le brevet américain n° 5,976,896 l'utilisation de capillaires pour effectuer des dosages d'analytes en phase hétérogène selon un procédé pouvant être réalisé conformément à plusieurs variantes :

- selon une première variante de ce procédé, un premier récepteur de l'analyte à détecter est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant l'analyte est préincubé avec un second récepteur (ne possédant pas le même site de fixation sur l'analyte que le premier récepteur fixé sur le capillaire) marqué avec un composé fluorescent. Cette solution, après réaction, est introduite dans le capillaire, le complexe analyte/récepteur marqué va alors se fixer sur la surface du capillaire en se liant au premier récepteur. Après lavage, le signal fluorescent, qui est proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon, est mesuré ;

- selon une deuxième variante de ce procédé, un analogue de l'analyte est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant l'analyte à détecter, préalablement préincubé avec un récepteur de l'analyte marqué avec un composé fluorescent, est introduit dans le capillaire. Il va se produire une compétition entre l'analyte fixé sur la surface du capillaire et l'analyte éventuellement présent dans l'échantillon pour la fixation sur le récepteur marqué. Après lavage, le signal fluorescent, qui est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon, est mesuré ;

- selon une troisième variante de ce procédé, un récepteur de l'analyte à détecter est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant l'analyte préalablement mélangé avec un analyte marqué ou un analogue de cet analyte marqué avec un composé fluorescent est introduit dans le capillaire. Il va alors se produire une compétition entre le composé marqué et l'analyte de l'échantillon pour la fixation sur le récepteur fixé à la surface du capillaire. Après lavage, le signal fluorescent, qui est inversement proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon, est mesuré.



Les différentes étapes de ces dosages (incubations, lavages) et la nécessité de mélanger l'analyte avec un composé marqué rend difficilement applicable ce dosage à un dosage en continu car cela impliquerait un apport permanent en réactif.

Par ailleurs, l'ensemble des procédés de détection d'analytes en phases hétérogènes précédemment décrits nécessite le plus souvent la réalisation d'une étape distincte de régénération de la phase solide avant de pouvoir effectuer une nouvelle détection de l'analyte au sein d'un nouvel échantillon. Cette étape limitante de régénération de la phase solide interdit par conséquent l'application de ces différents procédés à la détection en continu d'un analyte dans un milieu.

C'est donc afin de remédier à l'ensemble de ces inconvénients et de pourvoir en particulier à un procédé de détection en phase hétérogène d'un analyte, qui soit simple à mettre en œuvre, automatisable et au cours duquel l'étape de régénération de la phase solide puisse être réalisée simultanément à l'étape de détection de l'analyte proprement dite sans interrompre cette dernière, que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de la présente Invention.

Les Inventeurs se sont également donnés pour but de pourvoir à un nouveau réactif utilisable dans des procédés de détection d'analytes en phase hétérogène permettant d'éviter toute incubation, préalablement à l'étape de détection proprement dite, de l'analyte avec un anticorps marqué ou un analyte marqué.

La présente Invention a donc pour premier objet un procédé de détection d'un analyte a dans un échantillon fluide, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

1) la saturation d'un support solide comportant, sur au moins une partie de sa surface, au moins un réactif trifonctionnel (tripode Y) comportant les trois pôles fonctionnels suivant :

- i) un groupement luminescent (L),
- ii) une molécule (B) choisie parmi l'analyte a, un analogue de l'analyte a ou un fragment de l'analyte a; et
- iii) une fonction assurant la fixation dudit réactif trifonctionnel sur la surface dudit support solide ;

par un récepteur de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé accepteur (Q) (récepteur-Q) de la luminescence du groupement L, pour former un complexe C entre ladite molécule (B) et ledit récepteur-Q ;

2) la mise en contact du support solide obtenu à l'étape 1) avec un échantillon fluide susceptible de renfermer l'analyte a à détecter ;

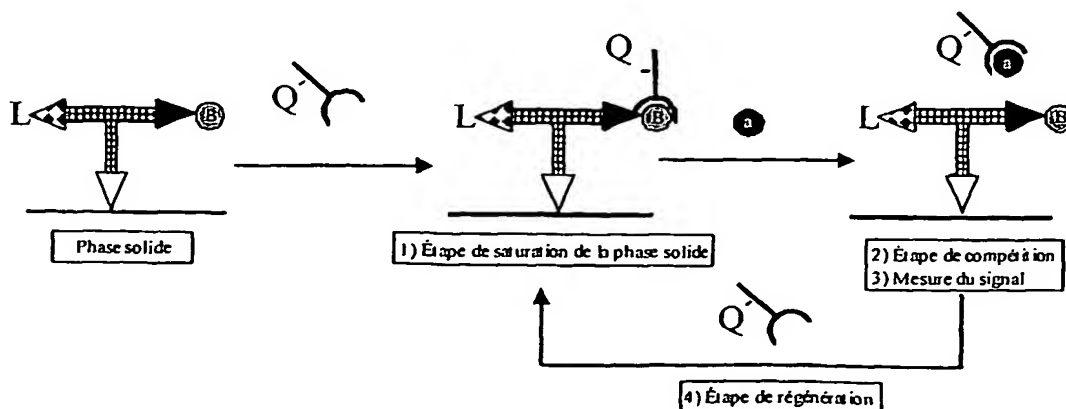
3) la mesure de l'intensité du signal émis par le groupement L qui est proportionnelle à la quantité d'analyte a présent au sein de l'échantillon fluide ; et

4) la régénération du support solide par mise en contact dudit support solide avec du récepteur-Q.

Selon ce procédé, l'étape 1) permet la complexation de la molécule (B) avec le récepteur-Q. A l'issue de cette première étape la luminescence de L est diminuée ou supprimée. Lors de l'étape 2), la mise en présence de l'échantillon avec la surface du support solide va induire, lorsque ledit échantillon renferme l'analyte a, une compétition entre l'analyte a et la molécule (B) pour la formation du complexe avec le récepteur-Q. La liaison de l'analyte a sur le récepteur-Q va provoquer l'élimination du récepteur-Q de la surface du support solide et restaurer la luminescence émise par le composé (L) présent sur le tripode Y. L'intensité du signal mesuré lors de l'étape 3) est alors proportionnelle à la quantité d'analyte a présente dans l'échantillon à analyser. L'étape 4) de régénération va entraîner à nouveau la complexation du récepteur-Q sur le tripode Y et ainsi la suppression de la luminescence de L pour permettre une nouvelle détection de l'analyte a au sein d'un nouvel échantillon.

Le principe du procédé de détection d'un analyte a conforme à l'invention est schématisé sur le Schéma A ci-après :

#### SCHÉMA A



Le procédé de détection conforme à l'Invention présente un grand nombre d'avantages:

1) grâce en particulier à la conformation structurale particulière du tripode Y mis en œuvre au cours du procédé, l'étape de régénération de la phase solide  
5 peut être réalisée très facilement, et ce sans altération de ses propriétés. En effet, dans tous les dosages en flux précédemment décrits, la mesure du signal s'effectue après formation d'un complexe lié à la phase solide. Par conséquent, et même si certains des procédés de dosage décrits par l'état antérieur de la technique permettent plusieurs dosages successifs (Sheikh *et al.* et brevets américains n° 5,183,740 et 6,323,041 ; pré-  
10 cités), ceux-ci sont néanmoins en nombre limité, et nécessitent une étape de régénération du support solide souvent longue et contraignante, qui se traduit par la dissociation du complexe formé. De plus, les conditions drastiques de réalisation de ces étapes de régénération (passage de solutions acides ou basiques) imposent l'arrêt du procédé de détection interdisant ainsi toute application de ces procédés à des  
15 dosages en continu d'un analyte donné.

Par contre, selon le procédé de détection conforme à l'Invention, la présence de l'analyte a dans l'échantillon entraîne la dissociation entre le récepteur-Q et la molécule (B), l'étape de régénération consiste donc tout simplement à reformer ce complexe en ajoutant du récepteur-Q. Cette étape de régénération n'implique donc pas  
20 l'utilisation de solutions acides ou basiques pouvant altérer les propriétés des molécules de la phase solide ou une réaction d'échange entre deux molécules au niveau du site de liaison du récepteur dont la cinétique est plus longue que la réaction de formation d'un complexe.

2) le signal mesuré au niveau de la région sur laquelle a été immobilisé le tripode Y ce qui permet d'obtenir un signal localisé, contrairement aux  
25 dosages développés selon l'art antérieur, notamment par Sheikh *et al.*, ainsi que dans les brevets américains n° 5,183,740 et 6,323,041 pré-cités, dans lesquels le signal, lié à des molécules en solution, est mesuré à la sortie d'un capillaire.

3) le signal étant localisé, plusieurs molécules pourront être  
30 détectées simultanément sur le même support solide en fixant sur des zones distinctes et connues de celui-ci plusieurs types tripodes Y différant les uns des autres par la nature de la molécule (B) qu'ils comprennent.

4) le signal mesuré correspond à la totalité des molécules d'analyte a ayant été en contact avec le support solide entre deux régénérations. Cette particularité du procédé conforme à l'Invention autorise un suivi permanent tout en effectuant des mesures espacées dans le temps.

5) ce format de dosage est applicable à l'ensemble des molécules car il ne requiert pas la liaison simultanée de deux récepteurs sur l'analyte comme cela est quelque fois nécessaire selon les procédés de dosage antérieurement connus comme par exemple dans le procédé décrit par Plowman T.E. *et al.*, pré-cité) et qui nécessitent une taille suffisante de l'analyte.

6) la présence de l'analyte a dans l'échantillon se traduit par une apparition de signal contrairement à la plupart des dosages par compétition connus de l'art antérieur, l'apparition d'un signal autorisant une détection plus aisée.

7) enfin, le système de détection utilisant le phénomène de transfert d'énergie, il permet également de détecter et de quantifier la présence d'un analyte a par la variation de la luminescence du composé Q s'il est fluorescent ou la variation du temps apparent de décroissance de la luminescence du composé (L).

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée du procédé conforme à l'Invention, les étapes 3) de mesure de l'intensité du signal émis et 4) de régénération de la surface du support solide sont réalisées en continu.

Selon l'Invention, le support solide est de préférence choisi parmi les matériaux comportant à leur surface, de façon naturelle ou après modification, des fonctions aptes à former une liaison de nature covalente avec une fonction complémentaire du tripode Y. Ces fonctions peuvent notamment être des fonctions hydroxyle, amine, sulfhydryle ou carboxyle.

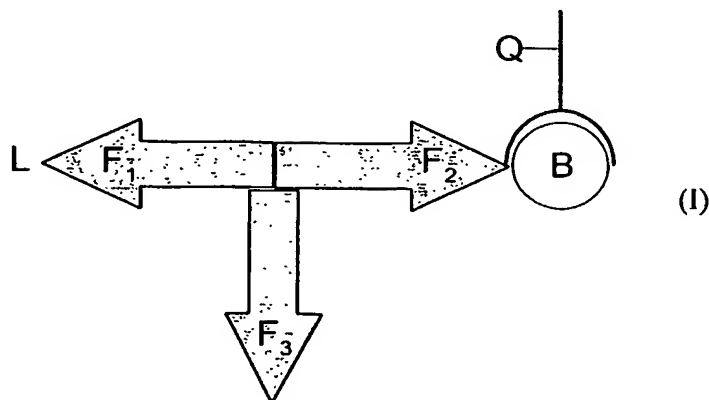
Parmi de tels matériaux, on peut en particulier citer les verres, les plastiques (par exemple le polystyrène), les céramiques (de préférence de type oxyde), les métaux (par exemple l'aluminium ou l'or) et les métalloïdes (tel que le silicium oxydé).

De tels supports peuvent notamment se présenter sous la forme de tubes, de capillaires, de plaques telles que des microplaques, de billes ou sous toute autre forme appropriée à la réalisation du procédé conforme à l'Invention.

L'échantillon fluide contenant ou non l'analyte a à détecter peut être de nature ou d'origine diverses telles que par exemple de l'eau, un milieu biologique liquide, ou bien encore un liquide contenant des molécules gazeuses dissoutes ou provenant d'échantillons solides.

5 La mesure de l'intensité du signal émis lors de l'étape 3) peut être effectuée par un détecteur de luminescence tel que par exemple un fluorimètre.

Selon le procédé conforme à l'invention, le complexe C formé à l'issue de l'étape 1) de saturation est de préférence choisi parmi les complexes de formule (I) suivante :



10 dans laquelle :

- les flèches représentent la structure du squelette du tripode Y qui est un bras de liaison constitué par une chaîne peptidique, nucléotidique, glucosidique ou par une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ; lesdites chaînes étant éventuellement substituées, interrompues et/ou terminées par un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, O ou S et/ou par un ou plusieurs acides aminés, et comportant trois fonctions chimiques réactives  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  ;

- L représente un groupement luminescent lié de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive  $F_1$  ;

20 - B représente un analyte a, un analogue structural d'un analyte a ou un fragment d'un analyte a sur lequel est fixé, de façon non covalente et réversible, un récepteur spécifique de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé Q ; la molécule (B) étant liée de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive  $F_2$  ;

- Q représente un composé accepteur de la luminescence du groupement L ;

- F<sub>3</sub> représente une fonction chimique réactive apte à permettre la fixation du tripode Y sur la surface du support solide.

5 Selon l'Invention et indépendamment l'une de l'autre, les fonctions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> assurent :

i) soit une liaison directe *via* une fonction chimique correspondante présente sur le composé luminescent, la molécule (B) ou la phase solide ;

10 ii) soit une liaison indirecte. Dans ce deuxième cas, la liaison peut être réalisée en couplant à l'une au moins des fonctions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et/ou F<sub>3</sub>, une molécule M<sub>1</sub> apte à former un complexe avec une molécule M<sub>2</sub> préalablement fixée sur au moins une partie de la surface de la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le groupement luminescent. A titre d'exemple, on peut notamment coupler de la biotine ou de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) sur l'une des fonctions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub>  
15 et respectivement de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) ou de la biotine sur la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le composé luminescent. Selon une autre variante du procédé conforme à l'Invention, cette liaison indirecte peut également s'effectuer *via* une molécule M<sub>3</sub>, préalablement couplée sur la phase solide avec un ou plusieurs composés luminescents ou molécules (B) et qui sera couplée à la fonction  
20 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ou F<sub>3</sub>. A titre d'exemple de molécules M<sub>3</sub>, on peut notamment utiliser des protéines telles que l'albumine et la polylysine, des nucléotides, des sucres ou encore d'autres dérivés synthétiques.

De préférence, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub>, identiques ou différentes, sont choisies parmi les fonctions thiols ; amines ; alcools ; acides tels que les fonctions acide  
25 carboxylique; esters tels que les esters activés comme par exemple les esters succinimydiliques et les anhydrides ; isothiocyanates ; isocyanates ; acylazides ; chlorures de sulfonyle ; aldéhydes ; glyoxals ; époxydes ; oxiranes ; carbonates ; imidoesters ; carbodiimides ; maléimides ; nitriles, aziridines ; acryloyl ; les dérivés halogénés ; les groupements disulfides ; phosphorés tels que par exemple les  
30 phosphates, phosphonates, phosphines et phosphites ; diazo ; carbonyldiimidazole ; hydrazides ; arylazides ; hydrazines ; diazirines ; magnésiens ; lithiens ; cuprates ; zinciques et les systèmes insaturés.

Parmi ces différentes fonctions et groupements, on peut en particulier citer les fonctions amines telles que celles de formules  $R-NH_2$ ,  $R-NH-$ ,  $(R)_3-N$ ,  $R-NH-OR$  et  $NH_2-OR$  ; les fonctions alcool  $R-OH$  ; et les groupements halogénés de formule  $R-X$  avec  $X$  représentant un atome d'halogène tel que le chlore, l'iode, le brome ou le fluor ; étant entendu que dans lesdites formules  $R$  représente un radical, alkyle, de préférence en  $C_1-C_{15}$ , aryle, vinyle, ou allyle.

Selon l'Invention, on entend par groupement aryle, tout groupement aromatique possédant un ou plusieurs noyaux benzéniques, naphthalénique ou anthracéniques, lesdits noyaux contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes tels que  $O$ ,  $N$  ou  $S$ , et étant éventuellement substitués par un ou plusieurs groupes choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux alkyles en  $C_1-C_4$ , amino, aminoalkyle en  $C_1-C_4$ , alkyl( $C_1-C_4$ )aminoalkyle en  $C_1-C_4$ , dialkyl( $C_1-C_4$ )aminoalkyle en  $C_1-C_4$ , nitro, alkylèneamino en  $C_1-C_4$  ou alkénylèneamino en  $C_2-C_4$ .

Parmi de tels groupements aryle, on peut en particulier citer les groupements benzyle, phényle, crésyle, toluyle, pyridine, pyrimidine et pyrazine.

Selon l'Invention, on entend par groupement luminescent toute substance qui, quand elle est excitée à une longueur d'onde donnée ou par un composé chimique donné, est capable d'émettre un photon, par exemple fluorophore ou terre rare.

Parmi de tels groupements luminescents, on peut notamment citer la fluorescéine (fluorescéinate de sodium) et ses dérivés tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; la rhodamine et ses dérivés tels que la tetraméthyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) ; le diaminidophényl indo (DAPI) ; l'acridine ; les colorants fluorescents à amines réactives tels que l'ester succinimidylique de l'acide 6-((7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétyl)amino) hexanoïque (AMCA) ; les colorants fluorescents vendus sous les dénominations commerciales BODIPY® tels que BODIPY® FR-Br<sub>2</sub>, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR et les BODIPY® 530/550 (longueur d'onde d'excitation/longueur d'onde d'émission, en nm), 558/56/, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650 et 650/665 vendus par la société Bio-Rad Inc. (USA), les colorants Cascade Blue (Trilink BioTechnologies (USA), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, et Cy7 (Bio-Rad Inc., USA), DABCYL® et EDANS® (Eurogentec, BE) ; l'Eosine ; l'Erythrosine ; le 6-Fam et le Texas Red.

Selon l'Invention, on entend par "récepteur" toute substance apte à former une liaison non covalente et réversible (complexe) avec l'analyte, un analogue de l'analyte ou un fragment de ce dernier. Ce récepteur est bien évidemment choisi en fonction de la nature de la molécule (B) du tripode Y.

5 Ces récepteurs peuvent notamment être choisis parmi les composés de nature biologique (anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante (Fab', Fab, scFv), récepteurs, acides polynucléiques (ADN ou ARN), acides peptidonucléiques, lectines ou bien encore protéines transporteuses) et les composés de nature chimique tels que par exemple les chélates et les récepteurs synthétiques  
10 spécifiques.

Parmi de tels récepteurs, on peut par exemple citer les anticorps monoclonaux anti-Substance P anti-protéine prion, anti-angiotensine II, la poly-Histidine, le système nitrilo-acide triacétique-Nickel (NTA-Nickel), les sondes nucléotidiques complémentaires.

15 Selon une variante préférée du procédé de détection conforme à l'Invention, ledit récepteur présente une plus grande affinité pour l'analyte a que pour la molécule (B).

Selon l'Invention, on entend par "composé accepteur" (Q), toute molécule permettant la diminution ou la disparition de la luminescence du composé  
20 luminescent (L) lorsque le récepteur est complexé à la molécule (B). Ce composé, de natures diverses, peut notamment être un composé chimique (luminescent ou non), un atome lourd ou une nanoparticule.

Parmi de tels composés (Q), on peut en particulier citer les composés fluorescents tels que ceux cités ci-dessus pour les groupements L, la  
25 rhodamine et ses dérivés tels que la tetraméthyl rhodamine (TMR), des molécules non-fluorescentes telles que les composés vendus sous les dénominations commerciales Black Hole Quencher ® 1, 2 et 3 (Biosearch Technologies), Nanogold Particules ® (Nanoprobes), Eclipse Dark Quencher ® (Epoch Bioscience), Elle Quencher ® (Oswell), le vert de malachite, et les colorants QSY ® 7, QSY ® 9 et  
30 QSY ® 21 (Molecular Probes).

Lorsque la molécule (B) est un peptide ou un oligonucléotide, alors le tripode Y utilisé selon le procédé conforme à l'Invention peut être préparé en



effectuant une synthèse peptidique ou oligonucléotidique au cours de laquelle on ajoute à ladite molécule (B) au moins un acide aminé (ou nucléotide modifié) comportant une fonction (F<sub>1</sub>) et un autre acide aminé (ou nucléotide modifié) comportant une fonction (F<sub>3</sub>), F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> ayant les mêmes significations que celles indiquées ci-dessus. Dans ce cas, F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> assurent également la liaison respectivement avec le composé luminescent (L) et la surface de la phase solide. Tout comme précédemment, les acides aminés (ou nucléotides) comportant les fonctions chimiques F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> peuvent également être substitués par un acide aminé (ou nucléotide) couplé à une biotine (par exemple le produit 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)-Lysine(Biotine)-OH, vendu par la société Calbiochem-Novabiochem AG). Dans ce cas, cet acide aminé (ou nucléotide) assurera la liaison avec la surface de la phase solide ou avec le composé luminescent (L) sur lesquels on aura préalablement couplé de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) pour former une liaison indirecte.

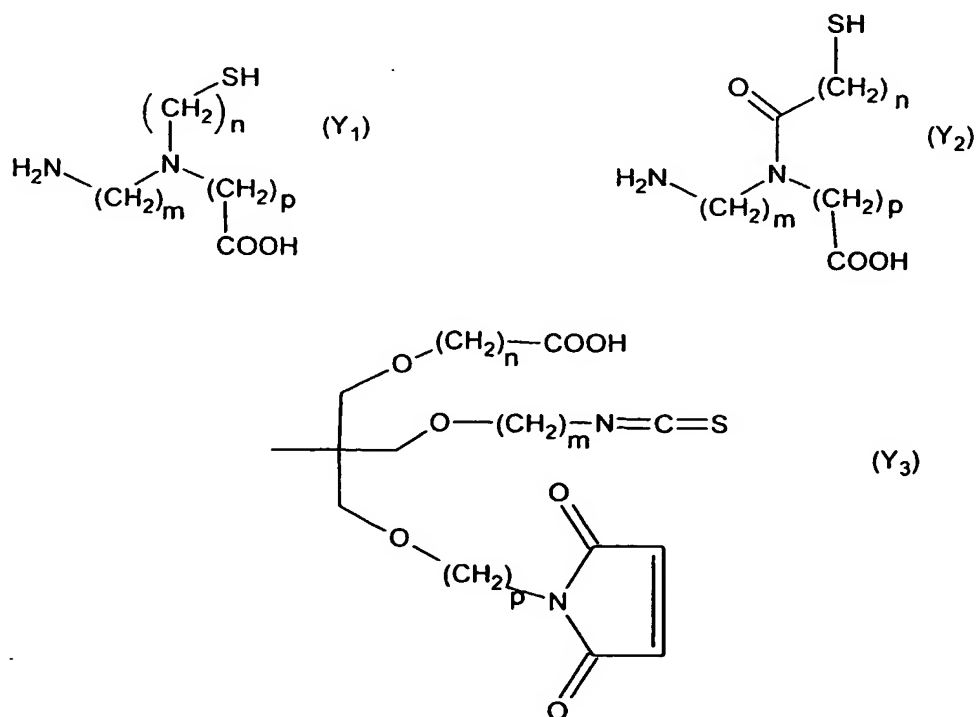
Parmi les complexes C de formule (I) conformes à l'Invention, on peut notamment citer les composés dans lesquels :

i) (B) est choisi parmi les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres et les acides peptidonucléiques,

ii) L est de la fluorescéine, et

iii) le squelette du tripode Y est choisi parmi les structures Y<sub>1</sub> à Y<sub>3</sub>

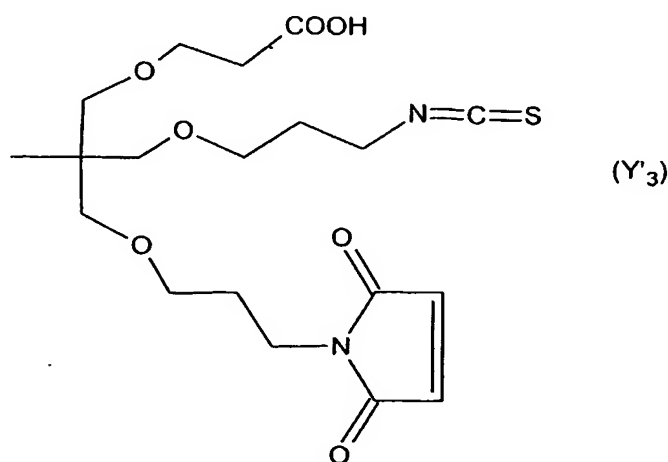
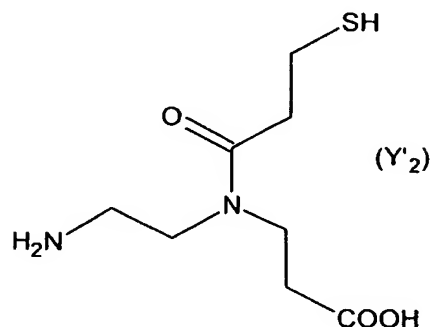
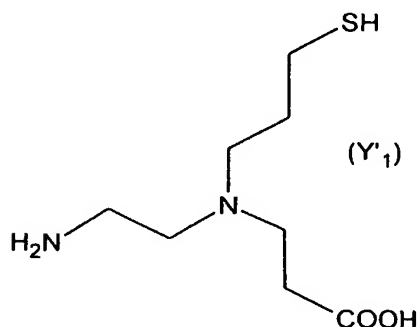
suivantes :



dans lesquelles n, m et p, identiques ou différents, sont des nombres entiers compris entre 1 et 20 inclusivement.

Parmi ces structures Y<sub>1</sub> à Y<sub>3</sub>, les composés de formules (Y'<sub>1</sub>) à (Y'<sub>3</sub>) suivantes sont particulièrement préférés :

5



Les tripodes Y utilisés dans le procédé conforme à l'Invention peuvent être préparés par analogie selon les procédés de synthèse organique et peptidique classiquement mis en œuvre et bien connus de l'homme du métier.

Les complexes C de formules (I) tels que décrits précédemment sont des composés nouveaux en soi qui, à ce titre, constituent un autre objet de l'Invention.

Ces complexes C de formule (I) peuvent être préparés en complexant un tripode Y conforme à l'Invention avec un récepteur-Q selon les procédés classiquement mis en œuvre dans l'état de la technique.

L'Invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un complexe C de formule (I) dans un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte a au sein d'un échantillon fluide.

Enfin, l'Invention a pour objet un dispositif de détection en continu en phase hétérogène d'au moins un analyte a dans un échantillon fluide, ledit dispositif étant caractérisé par le fait qu'un échantillon fluide à analyser est intégré dans un milieu formant un flux s'écoulant sur au moins un support solide à la surface duquel est fixé au moins un tripode Y conforme à l'Invention tel que décrit précédemment et spécifique de l'analyte a à détecter, un détecteur de luminescence disposé en regard du support solide est couplé à une commande de vanne asservie à un seuil d'intensité de signal émis par le détecteur et qui déclenche, pendant une durée déterminée, l'ouverture d'un réservoir renfermant un récepteur-Q apte à former un complexe avec le tripode Y, ce réservoir étant relié au support par une boucle de rétroaction qui débouche en amont du support solide sur lequel est fixé le tripode Y, afin de saturer et/ou régénérer ce dernier en récepteur-Q par passage dans le flux et complexation sur le tripode Y.

Selon des formes de réalisation particulières :

- les valeurs de l'intensité de la luminescence sont monitorées et accessoirement traduites en quantité d'analyte a par un système de calcul couplé au détecteur de luminescence ;
- un marqueur d'évènement tel que par exemple une alarme, est disposé dans la boucle de rétroaction afin de signaler une variation de l'intensité du signal supérieure à une valeur prédéterminée ;
- le support solide est un capillaire couplé à l'environnement contenant l'échantillon à analyser, le couplage étant réalisé soit par l'intermédiaire d'un ballon de capture où l'échantillon barbote dans un milieu correspondant à celui du flux d'écoulement, soit par l'intermédiaire d'un conduit souple ;
- le flux est entraîné par la dépression produite par une pompe, un piston, ou équivalent.

Ces dispositifs peuvent notamment être utilisés pour détecter la présence d'un analyte a dans un milieu naturel tels que dans des lacs et rivières notamment ou dans des milieux industriels tels que piscines, usines, stations

d'épuration, systèmes de ventilation ou de climatisation, etc. Ils peuvent, le cas échéant, être équipés d'un ballon de capture et d'un système de barbotage permettant de collecter des échantillons sous forme gazeuse tel que l'air et de solubiliser les constituants à détecter qu'ils renferment.

5                   Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de synthèse de squelettes de tripodes Y, à un exemple de synthèse d'un complexe de formule (I) et à deux exemples de détection de la substance P dans un échantillon fluide, ainsi qu'aux figures 1 à 8 annexées dans lesquelles :

10                   - la figure 1 illustre une vue générale d'un exemple non limitatif de dispositif de détection en phase hétérogène selon l'Invention, pour mesurer la présence d'un analyte a dans une cuve de station d'épuration d'eau. Selon ce dispositif, un tuyau souple 1 relié à une sortie de cuve est monté sur un tube capillaire 3. Ce tube sert de support de fixation à deux types de tripode selon l'Invention, à  
15                   savoir Ya et Yb, permettant la détection spécifique de deux types d'analytes. L'échantillon liquide provenant de la cuve est débité en flux continu (flèches Fa) dans le capillaire 3 par l'action d'une pompe péristaltique 5 puis évacué. A proximité du capillaire et face à chaque zone du capillaire sur laquelle sont fixés les tripodes Ya et Yb, il est prévu de positionner un fluorimètre, 7a et 7b, détecteur de fluorescence.  
20                   Chaque détecteur est relié à un réservoir de récepteurs-Q, 9a et 9b, respectivement spécifiques des tripodes Ya et Yb. Les réservoirs sont reliés par des canaux latéraux, 11a et 11b, et un canal commun 11c, au capillaire 3, en amont des zones sur lesquelles sont fixés les tripodes Ya et Yb par rapport au sens d'écoulement du flux. Le canal commun est soudé perpendiculairement au capillaire 3 et l'ensemble des canaux  
25                   forme des boucles de rétroaction. Chaque détecteur est couplé à une commande de vanne, respectivement 13a et 13b, pour ouvrir le réservoir correspondant, respectivement 9a et 9b, et permettre à son contenu de se déverser dans le capillaire 3 (flèches Fb), puis de se complexer sur le tripode spécifique correspondant, Ya ou Yb, via les canaux 11a, 11b et 11c afin de régénérer ce tripode. Dans cet exemple, la  
30                   régénération peut être réalisée en continu, le seuil de déclenchement de cette opération de régénération correspondant à la variation de luminescence minimale pouvant être détectée suivant la sensibilité du détecteur. Un marqueur d'évènement 15a

(respectivement 15b) est montée dans chaque boucle de rétroaction. En fonctionnement, et après étalonnage, l'intensité du signal fluorescent, la et lb, émis par les tripodes Ya et Yb est mesurée par le fluorimètre, ce qui permet de calculer, à l'aide d'un ordinateur annexé (non représenté), la concentration moyenne en analyte sous examen dans l'échantillon. La commande d'ouverture de vanne 13a (respectivement 13b) est asservie à l'intensité de signal fluorescent mesurée par le détecteur correspondant. L'ouverture de la vanne correspondante est alors déclenchée pendant la durée correspondant à la régénérescence des tripodes concernés. Si l'analyte a est présent dans l'échantillon lors de la régénération, cela se traduit par une augmentation de la durée de celle-ci (une partie du récepteur-Q se complexant à l'analyte a). La durée de la régénération peut être déterminée par le temps nécessaire à un retour de la fluorescence au niveau basal ; si celle-ci est supérieure à une valeur prédéterminée, un marqueur d'évènement pourra être déclenché. Lorsque l'intensité du signal varie d'une quantité supérieure à une valeur prédéterminée, pendant un écart de temps donné, le marqueur d'évènement 15a (respectivement 15b) signale ce fait par un avertissement 16 visuel et/ou sonore. Le signal fluorescent correspondant à l'ensemble des analytes a ayant transité dans le capillaire entre deux régénérations, la lecture de la fluorescence peut également être effectuée à intervalles de temps réguliers. Dans d'autres exemples, lorsque l'échantillon est un gaz, le milieu mis en œuvre et les moyens de création de flux sont adaptés par l'homme du métier.

- la figure 2 représente la fluorescence mesurée en unités arbitraires après immobilisation sur une plaque de microtitration, *via* la neutravidine, d'un tripode Y comprenant de la fluorescéine à titre de composé (L) et un analogue de la Substance P à titre de molécule (B), en fonction de la concentration en tripode en  $\mu\text{M}$  ;

- la figure 3 représente la courbe de diminution de la fluorescence (en unités arbitraires) d'un tripode comprenant de la fluorescéine à titre de composé (L) et un analogue de la Substance P à titre de molécule (B) en fonction de la quantité d'anticorps monoclonal anti-substance P marqué à la tetraméthyl rhodamine (mAb SP31-TMR) (en nM) qui se complexe au tripode ;

- la figure 4 représente le pourcentage d'inhibition par la substance P de la diminution de la fluorescence provoquée par le mAb SP31-TMR (% ID) est exprimé en fonction de la concentration en substance P (en nM) ;

- la figure 5 représente la fluorescence mesurée (en unités arbitraires) après mise en contact d'un support solide sur lequel est fixé un tripode Y conforme à l'invention, ledit tripode étant ou non complexé au mAb SP31-TMR (puits Fl : fluorescence mesurée en absence de mAb SP31-TMR et de Substance P et puits Fl<sub>0</sub> : fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR mais en absence de Substance P), et avec différentes concentrations de substance P (puits Fl<sub>x</sub> : fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR avec x = concentration en substance P : 1 ; 0,1 ou 0,01  $\mu$ M), et ce lors d'un premier dosage, puis après régénération du support et enfin après une nouvelle mise en contact des puits avec les trois concentrations de substance P ;

- la figure 6 représente la moyenne de fluorescence mesurée (en unités arbitraires) pour chacun des puits Fl, Fl<sub>0</sub> et Fl<sub>x</sub>, après 11 cycles de dosage de la substance P et de régénération ;

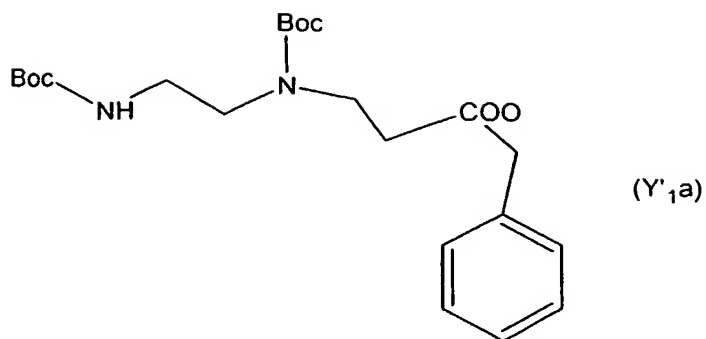
- la figure 7 représente la fluorescence (en unités arbitraires) mesurée pour chacun de 11 dosages effectués dans des puits Fl, Fl<sub>0</sub> et Fl<sub>x</sub>, avec x = 1  $\mu$ M de substance P ;

- la figure 8 représente l'évolution de la fluorescence (en unités arbitraires) en fonction du temps d'un capillaire fonctionnalisé par un tripode Y conforme à l'invention, mise en contact avec un anticorps monoclonal mAb SP31 marqué (Zone 1), puis avec de la substance P (Zone 2) et régénéré par mise en contact du tripode fixé au capillaire avec l'anticorps monoclonal mAb SP31 marqué (Zone 3. ) ; les deux dernières étapes étant répétées trois fois.

#### **EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'<sub>1</sub>) D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION**

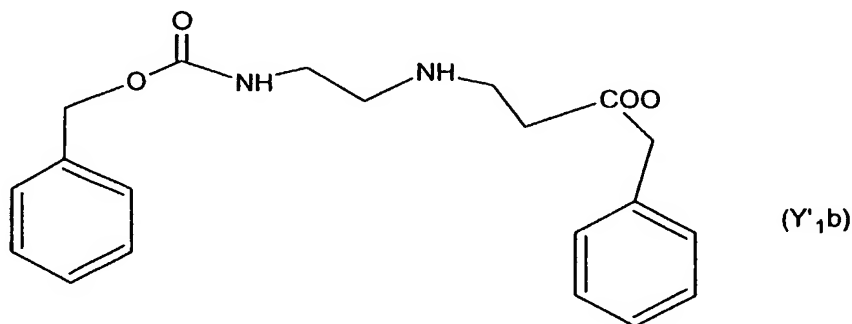
On fait réagir un équivalent de 1,2-éthylldiamine avec deux équivalents de (Boc)<sub>2</sub>O pour conduire au bis-(tertiobutyloxycarbonylamino)-1,2-éthyl qui est ensuite mis à réagir avec un équivalent de phényl-3-bromopropanoate en présence d'hydruure de sodium pour conduire au composé de formule (Y'<sub>1</sub>a) suivante:

22

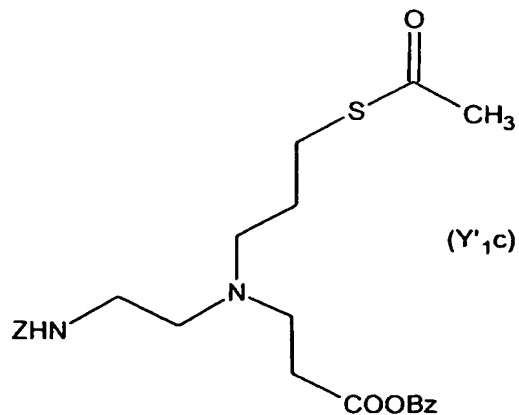


On déprotège le composé Y'1a en milieu trifluoroacétique puis on réalise la condensation du composé déprotégé obtenu en présence de triéthylamine (TEA) et de un équivalent de chlorure de Z (avec Z = carbobenzyloxy) pour obtenir

5 un composé de formule (Y'1b) suivante :



Le composé de formule (Y'1b) conduit ensuite, en présence de S-(3-chloropropyl) éthanethioate et de TEA, au composé de formule (Y'1c) suivante :

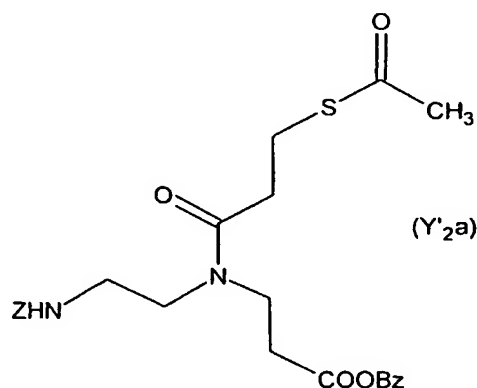


dans laquelle Z a la même signification que celle indiquée pour le composé de formule (Y'1b) ci-dessus et Bz désigne un groupement benzyle.

On déprotège les fonctions acide et amine primaire du composé de formule (Y'1c) en présence de palladium sur charbon et la fonction thiol par action d'hydroxylamine pour conduire au composé de formule (Y'1).

**EXEMPLE 2 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'2)  
D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION**

De l'acide 3-[(2-oxopropyl)thio]propanoïque, préparé à partir d'acide 3-bromopropanoïque et d'acide éthanethioïque est mis à réagir avec le composé de formule (Y'1b) obtenu ci-dessus à l'exemple 1 pour conduire au composé de formule (Y'2a) suivante :



dans laquelle Z désigne un groupement carbobenzyloxy et Bz désigne un groupement benzyle.

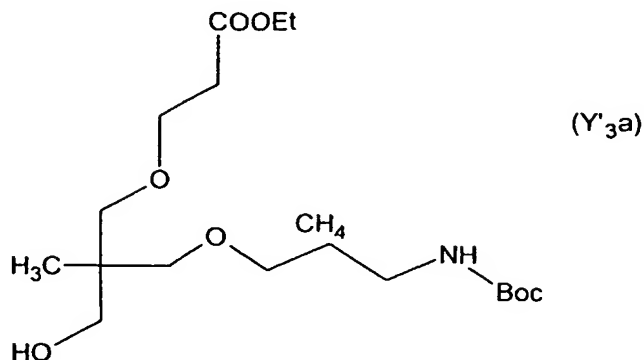
On déprotège les fonctions acide et amine primaire du composé de formule (Y'2a) ci-dessus en présence de palladium sur charbon et la fonction thiol par action d'hydroxylamine pour conduire au composé de formule (Y'2) décrit précédemment.

**EXEMPLE 3 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'3)  
D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION**

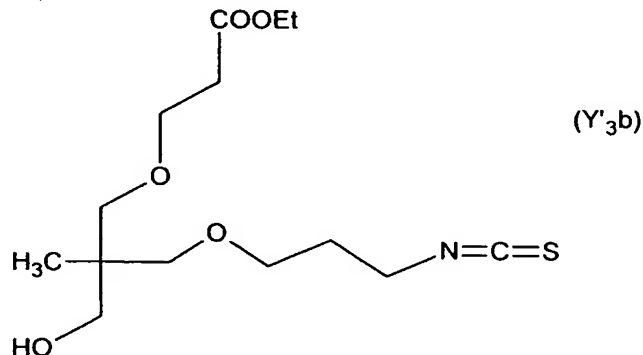
On fait réagir un équivalent de 2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol et un équivalent d'éthyl 3-bromopropanoate en présence d'hydrure de sodium pour conduire à l'éthyl 3-[3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropoxy]propanoate. On fait ensuite réagir ce composé, en présence d'hydrure de sodium, avec



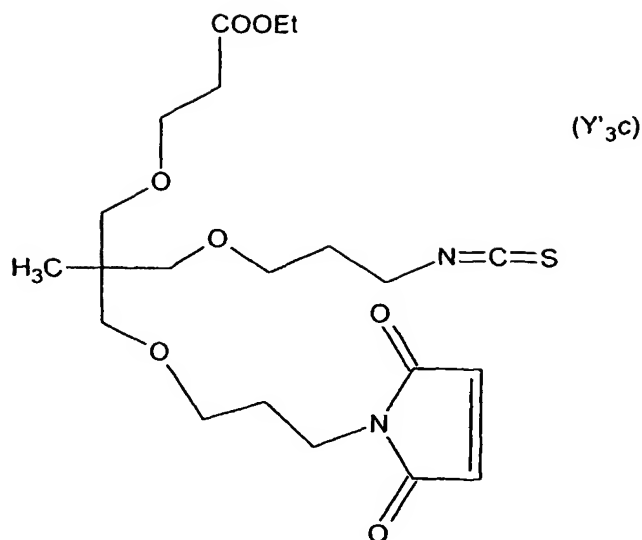
un équivalent de *tert*-butyl 3-bromopropylcarbamate pour conduire au composé de formule (Y'3a) suivante :



Le composé de formule (Y'3a) ci-dessus est ensuite déprotégé en milieu trifluoroacétique puis mis à réagir avec du dithioxométhane en présence de soude puis le groupement carboxylique est reprotégé par une mélange éthanol/acide sulfurique, pour conduire au composé de formule (Y'3b) suivante :



On fait ensuite réagir le composé de formule (Y'3b) ci-dessus avec du 1-(3-iodopropyl)-1H-pyrrole-2,5-dione en présence d'hydrure de sodium pour conduire au composé de formule (Y'3c) suivante :



qui en présence de soude conduit au composé (Y'3).

**EXEMPLE 4 : PRÉPARATION D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION**

5 Dans cet exemple, on illustre la préparation d'un tripode Y conforme à l'Invention comportant :

- un analogue de la substance P à titre de molécule (B),
- une fonction NH<sub>2</sub> permettant la fixation du tripode sur la surface d'un support solide (F<sub>3</sub>),

10 - de la fluorescéine à titre de composé luminescent (L).

1) Préparation d'un analogue de la substance P

Pour mémoire, la séquence de la substance P (Poids moléculaire : PM = 1349) est la suivante :

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-CONH<sub>2</sub>

15 soit (SEQ ID N°1)-CONH<sub>2</sub>.

On prépare un analogue de la substance P correspondant à la séquence suivante (PM : 1907) :

Lys-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-Met-CONH<sub>2</sub> ;

20 soit (SEQ ID N°2)-CONH<sub>2</sub>

Pour ce faire, le couplage de l'analogue de la substance P et de la biotine ainsi que de la fonction  $\text{NH}_2$  s'effectue au cours d'une synthèse peptidique selon une méthode connue de l'homme de l'art comme par exemple une synthèse en phase solide telle que décrite par Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85, 2149-2154). L'analogue de la substance P est un peptide analogue de la substance P comportant une alanine en position 10 [ $\text{Ala}^{10}$ ] qui a une réaction croisée de 13 % avec la substance P pour l'anticorps monoclonal SP31 (Déry O., Biopolymers, 1996, 39, 67-74) qui est utilisé dans le dosage décrit ci-après comme récepteur. Cette plus faible affinité de l'anticorps monoclonal SP31 (mAb SP31) pour cet analogue par rapport à la substance P, permettra un meilleur déplacement de l'anticorps fixé sur la phase solide. Sur cet analogue, la lysine en position 3 (Lys3) a également été substituée par une alanine afin d'éliminer l'amine primaire présente sur la chaîne latérale. La lys3 n'étant pas dans le site de reconnaissance du mAb SP31, cette substitution ne modifie par l'affinité de l'anticorps pour l'analogue. Par ailleurs, l'extrémité N-terminale a été modifiée par ajout d'une lysine possédant une molécule de biotine sur la chaîne latérale (Fmoc-Lys(biotine)-OH), et deux Sérines suivies d'une Lysine possédant deux fonctions  $\text{NH}_2$  dont une sur sa chaîne latérale.

Après la synthèse, le composé obtenu est purifié par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) puis lyophilisé.

#### 2) Marquage de l'analogue de la substance P avec de la fluorescéine (L)

100  $\mu\text{g}$  du composé obtenu ci-dessus en 1) ( $5,28 \cdot 10^{-8}$  mol) sont dissous dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon borate 0,1 M de pH 9. On ajoute ensuite 30,8  $\mu\text{l}$  ( $5,28 \cdot 10^{-7}$  mol) d'une solution de fluorescéine-NH-Succinimide (PM 586,55) (ester succinimidylique de l'acide hexanoïque (6-(fluorescéine-5-(et-6)-carboxamido) vendu sous la référence F-6129 par la société Molecular Probes, Inc.) à 10 mg/ml dans du diméthylformamide (DMF). Après 16 heures d'agitation à une température de 4°C, on ajoute 100  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl 1 M pH 9 et on poursuit l'agitation pendant 16 heures à 4°C, afin d'inactiver les fonctions esters actives résiduelles. Enfin, on ajoute 769,2  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,4 et 0,01 % d'azide de sodium. On obtient une solution d'un tripode Y conforme à l'Invention à 52,8  $\mu\text{M}$ ). Ce tripode est conservé à une température de 4°C.

### **EXEMPLE 5 : DÉTECTION ET DOSAGE DE LA SUBSTANCE P DANS UN ÉCHANTILLON**

#### **1) Préparation d'un récepteur-Q : marquage de l'anticorps monoclonal anti-substance P SP31 avec de la tetraméthyl rhodamine (TMR) (Q) (conjugué mAb SP31-TMR)**

5                   A 880 µl de mAb SP31 à 1,136 mg/ml (1 mg correspond à 6,67 nmole) en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, on ajoute 3,5 µl d'une solution de TMR (PM 527,5) (ester succinimidylique de la 5-(et-6)-carboxytetraméthylrhodamine ; vendu sous la référence C1171 par la société Molecular Probes, Inc., à 50 mg/ml dans le DMF (176 µg ; 333 nmole)). Après 16 heures d'agitation à 4°C, on ajoute 100 µl de

10   tampon Tris-HCl 1M pH 9 et on poursuit l'agitation pendant 16 heures à 4°C, afin d'inactiver les fonctions esters actifs résiduelles. Enfin, on sépare l'anticorps marqué de la TMR libre par chromatographie d'exclusion sur gel G-25 (Sephadex G-25 fine, Amersham Biosciences) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 renfermant 0,01 % d'azide de sodium. Les fractions correspondant à l'anticorps sont rassemblées

15   et on mesure l'absorbance de la solution à 280 et à 555 nm à l'aide d'une cuve dont le trajet optique est de 1 cm.

La concentration en anticorps est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Concentration (M)} = [A_{280} - (A_{555} \times 0,3)] / \epsilon$$

dans laquelle :

- 20                   -  $A_{280}$  est l'absorbance à 280 nm  
                       -  $A_{555}$  est l'absorbance à 555 nm  
                       - 0,3 est le ratio de l'absorbance de la TMR à 280 nm et à 555 nm  
                       -  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire (pour IgG  $\epsilon = 203000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ).

25                   On obtient une concentration en anticorps marqué de 1,36 µM.  
                       Le calcul du degré de marquage peut être fait selon l'équation suivante :

Nombre de molécules de TMR par molécule d'anticorps =

$$A_{555} / (65\,000 \times \text{concentration en anticorps})$$

30                   dans laquelle le nombre 65 000 correspond au coefficient d'extinction molaire à 555 nm de la TMR.

On obtient 3,6 moles de TMR par mole d'anticorps.

## 2) Préparation du support solide : Fonctionnalisation de la surface par de la neutravidine

Afin de pouvoir immobiliser le tripode Y préparé ci-dessus à l'exemple 4 sur un support solide, ce dernier est, dans un premier temps, fonctionnalisé par de la neutravidine.

### a) Réactifs utilisés

#### Tampon de saturation :

- tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,4 ;
- NaCl 0,15 M ;
- Albumine sérique bovine (BSA) vendue sous la référence A-7906 par la société Sigma : 0,1 % ;
- Azide de sodium 0,01 %

#### Tampon de lavage :

- Tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7,4 ;
- Tween ® 20 : 0,05 %

On dépose 100 µl d'une solution de neutravidine (vendue sous la référence 31 000 par la société Pierce) à 5 µg/ml dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 dans les puits de microplaques noires vendues sous la dénomination High Bind Matrix par la société VWR (référence 80120696). Après 16 heures à température ambiante, les plaques sont lavées avec du tampon de lavage puis saturées par dépôt de 300 µl/puits de tampon de saturation pendant 16 heures à température ambiante. Les plaques sont stockées avec le même tampon (300 µl/puits) à 4°C.

## 3) Fixation du tripode Y conforme à l'invention (marqué à la fluorescéine) sur les plaques de microtitration

On prépare une gamme de dilution du tripode Y (marqué à la fluorescéine) synthétisé ci-dessus à l'exemple 4 en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une concentration de 0,5 µM puis 4 dilutions successives au tiers (soit 0,167 µM ; 0,055 µM ; 0,0185 µM et  $6,2 \cdot 10^{-3}$  µM). On dépose 100 µl de chaque concentration en double dans des puits revêtus de neutravidine ou pour lesquels on n'a effectué que l'étape de saturation (témoin négatif). Après une incubation sous agitation pendant 3 heures à température

ambiante, on lave les plaques avec le tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. La lecture de la plaque est effectuée avec un fluorimètre Analyst AD system (LJL Biosystem) permettant la lecture de microplaques, à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à une longueur d'onde d'émission de 530 nm qui sont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant à la fluorescéine.

### Résultats

Les courbes obtenues avec neutravidine (carré noir) et sans neutravidine (triangle noir : témoin) sont représentées sur la figure 2 annexée sur laquelle la fluorescence (en unités arbitraires) est exprimée en fonction de la concentration en tripode Y conforme à l'Invention (µM).

Ces résultats montrent une augmentation de la fluorescence proportionnelle à celle de la concentration en tripode conforme à l'Invention jusqu'à une concentration de 0,17 µM puis un plateau correspondant à la saturation des sites de liaison de la neutravidine par le tripode. En absence de neutravidine immobilisée, aucune augmentation de la fluorescence n'est observée.

Dans les exemples qui suivent, le tripode Y de l'exemple sera utilisé à une concentration de 20 nM qui permet, au regard de ces résultats, d'obtenir un signal suffisant.

#### 4) Saturation de la phase solide par le mAb SP31-TMR pour former un complexe C

On prépare une gamme de dilution du mAb SP31-TMR en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une concentration de 100 nM puis 6 dilutions au tiers. On dépose 100 µl de chaque concentration en double avec 100 µl d'une solution du tripode Y de l'exemple 4 (solution à 20 nM dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4) dans les puits d'une microplaque. Après incubation pendant 16 heures à 4°C, on lave les microplaques à l'aide du tampon de lavage (5 fois), puis on dépose 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 3 annexées sur laquelle la fluorescence mesurée (en unités arbitraires) est exprimée en fonction de la concentration en mAb SP31-TMR (en nM).

Ces résultats montrent qu'à partir d'une concentration de 1 nM en anticorps, la fluorescence diminue proportionnellement à la concentration en mAb SP31-TMR, jusqu'à un maximum d'inhibition de 70 % obtenu à partir d'une concentration en mAb SP31-TMR de 33 nM. Ces résultats démontrent que :

5 i) l'anticorps se complexe au tripode Y conforme à l'Invention en reconnaissant l'épitope,

ii) la configuration du tripode Y conforme à l'Invention permet un transfert d'énergie par résonance de la fluorescéine à la TMR, qui se traduit par une diminution de la fluorescence de la fluorescéine.

10 5) Détection de la substance P sur support solide

On prépare une gamme de dilution de Substance P en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une concentration de 200 nM puis 6 dilutions au tiers. On dépose ensuite 100 µl du tripode préparé à l'exemple 4 (20 nM) et 100 µl de mAb SP31-TMR (30 nM) (ou 100 µl de  
15 tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits témoins négatifs) dans chaque puits. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, les plaques sont lavées à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4 annexée sur  
20 laquelle le pourcentage d'inhibition par la Substance P de la diminution de la fluorescence provoquée par le mAb SP31-TMR (% ID) est exprimé en fonction de la concentration en substance P (en nM).

Ce pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de l'équation suivante :

25 
$$\% ID = [(Fl_x - Fl_0)/(Fl - Fl_0)] \times 100$$

dans laquelle :

-  $Fl_x$  correspond à la fluorescence mesurée en présence de Substance P à la concentration x ;

-  $Fl$  correspond à la fluorescence mesurée en absence de mAb SP31-TMR et de Substance P ;  
30

-  $Fl_0$  correspond à la fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR et absence de Substance P.

Ces résultats montrent, comme attendu, que l'augmentation de la concentration en Substance P induit une augmentation de la fluorescence (correspondant à l'inhibition de la diminution) de la fluorescéine. On obtient ainsi une courbe standard dont la limite de détection en Substance P est d'environ 2 nM.

5 6) Test de régénération de la phase solide

On prépare trois dilutions de Substance P (respectivement 1 ; 0,1 et 0,01  $\mu$ M) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. On dépose ensuite 100  $\mu$ l du tripode Y tel que préparé ci-dessus à l'exemple 4 (20 nM) et 100  $\mu$ l de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits témoins négatifs : puits  $Fl_0$ ) dans chaque puits. On utilise le mAb SP31-TMR à 50 nM afin de complexer tous les tripodes présents sur la phase solide. Après une incubation de 16 heures à 4°C, on lave les plaques à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100  $\mu$ l de chaque concentration de Substance P en triple (puits  $Fl_x$ ). Les puits  $Fl$  et  $Fl_0$  sont également réalisés en triple. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave les plaques à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100  $\mu$ l de tapon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (premier dosage).

On lave à nouveau les plaques de la même façon que précédemment et on incube 100  $\mu$ l de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits  $Fl$ ) pendant 16 heures à 4°C. Les plaques sont à nouveau lavées (5 fois), puis on dépose 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (étape de régénération des plaques).

On lave de nouveau les plaques (5 fois) et on dépose soit 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium pour les puits  $Fl$  et  $Fl_0$  soit 100  $\mu$ l de Substance P (à 1 ; 0,1 ou 0,01  $\mu$ M). Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave les plaques (5 fois), puis on dépose 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (deuxième dosage).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5 annexée sur laquelle la fluorescence (en unités arbitraires) mesurée pour les puits  $Fl$ ,  $Fl_0$  et  $Fl_x$  est exprimée pour les premier et deuxième dosages ainsi que pour la mesure faite après l'étape de régénération.

Ces résultats mettent en évidence que :



i) les différentes étapes du procédé de détection (dépôts, lavages), n'entraînent pas la dissociation du tripode Y conforme à l'invention de la phase solide : la fluorescence mesurée dans les puits Fl est constante ;

5 ii) le dépôt du mAb SP31 permet une régénération homogène de la phase solide : mêmes valeurs de fluorescence pour tous les puits Fl<sub>x</sub> et Fl<sub>0</sub> ;

iii) la régénération est totale : la fluorescence mesurée pour les puits Fl<sub>x</sub> après l'étape de régénération est similaire à celle des puits Fl<sub>0</sub> effectuée au premier dosage ;

10 iv) cette étape de régénération est compatible avec un deuxième dosage effectué ultérieurement sur la même phase solide car on obtient les mêmes valeurs de fluorescence pour des concentrations en Substance P identiques.

#### 7) Mise en évidence de la faisabilité de dosages répétés sur une même phase solide

15 On prépare trois dilutions de Substance P (1 ; 0,1 et 0,01  $\mu$ M) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4.

20 i) On dépose 100  $\mu$ l du tripode préparé ci-dessus à l'exemple 4 (20 nM) et 100  $\mu$ l de mAb SP31-TMR (50 nM) ou 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 (témoin négatif : puits Fl<sub>0</sub>) dans chaque puits d'une microplaque. On utilise le mAb SP31-TMR à la concentration de 50 nM afin de complexer tous les tripodes présents sur la phase solide. Après une incubation de 16 heures à 4°C, on lave la microplaque à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100  $\mu$ l de chaque concentration de Substance P en triple. Les puits Fl et Fl<sub>0</sub> sont également réalisés en triple. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave la microplaque (5 fois) puis on dépose 100  $\mu$ l de  
25 tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (premier dosage).

ii) On lave à nouveau la plaque (5 fois) et on incube 100  $\mu$ l de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100  $\mu$ l de tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,4 pour les puits Fl) pendant 16 heures à 4°C (étape de régénération).

30 iii) On lave à nouveau la plaque (5 fois) et on dépose soit 100  $\mu$ l de tampon phosphate pour Fl et Fl<sub>0</sub>, soit 100  $\mu$ l de Substance P (à 1 ; 0,1 ou 0,01  $\mu$ M). Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave la

plaque (5 fois), puis on dépose 100  $\mu$ l de tampon phosphate et on mesure la fluorescence (deuxième dosage).

Pour les dosages suivants, on répète les étapes ii) et iii) en faisant varier les puits dans lesquels sont déposés le tampon phosphate pour  $Fl_0$  et les différentes concentrations de Substance P.

On réalise ainsi 11 dosages successifs sur la même phase solide.

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 6 et 7 annexées.

Sur la figure 6, la fluorescence (en unités arbitraires) correspond, pour chaque puits  $Fl$ ,  $Fl_0$  et  $Fl_x$ , à la moyenne des 11 dosages effectués. Sur la figure 7, la fluorescence (en unités arbitraires) correspond aux valeurs obtenues pour chacun des 11 dosages effectués pour les puits  $Fl$ ,  $Fl_0$  et  $Fl_x$  avec  $x = 1 \mu M$  de Substance P.

Ces résultats montrent que pour chaque concentration de Substance P, les valeurs de fluorescence sont homogènes et supérieures à celles obtenues en absence de Substance P. De plus, les fluctuations observées sont aléatoires ; il n'y a pas de baisse ou d'augmentation progressive de la fluorescence au fil des dosages.

Ces résultats montrent également que le procédé de détection conforme à la présente Invention permet le dosage répété d'un analyte sur une phase solide, chacun des puits (ou site de réaction) pouvant être régénéré de façon équivalente et permettre une nouvelle détection ultérieure.

## **EXEMPLE 6 : DETECTION DE LA SUBSTANCE P ET REGENERATION EN CAPILLAIRE**

### **1) Mode opératoire**

#### **a) Préparation des réactifs utilisés**

- Marquage du tripode avec une molécule fluorescente :

Le marquage de l'analogue de la substance P de séquence SEQ ID N°2 (tel décrit ci-dessus à l'exemple 4) avec une molécule fluorescente vendue sous la dénomination commerciale Alexa Fluor® 532 Protein Labeling Kit, référence A-10236 (Molecular Probes) est effectué selon le protocole décrit ci-dessus à l'exemple 4. On obtient un tripode-Alexa 532

- Préparation d'un récepteur-Q : marquage de l'anticorps mAb SP 31 avec une molécule fluorescente (conjugué mAb SP31-Alexa 647) :

Le marquage du mAb SP31 avec une molécule fluorescente vendue sous la dénomination commerciale Alexa® Fluor 647 Succinimidyl Esters, référence A-20006 (Molecular Probes) est effectué selon le protocole décrit ci-dessus à l'exemple 5, étape 1). On obtient un anticorps marqué mAb SP31-Alexa 647.

5                   - Préparation des capillaires :

On utilise des capillaires en borosilicate de section carrée (arête intérieure = 0,5 mm, extérieur = 1 mm, longueur = 25 mm) (Wale Apparatus). Les capillaires sont fonctionnalisés avec de la neutravidine, puis incubés dans une solution de tripode-Alexa 532 (solutions à 5µM) durant 1 nuit à 4°C.

10                   **b) Protocole expérimental**

Le capillaire fonctionnalisé est connecté par des tubulures Manifold de diamètre intérieur 0,51 mm (Bioblock) à une pompe Gilson, permettant le passage successif de différentes solutions.

15                   Pour la mesure de la fluorescence, on utilise un microscope à fluorescence (excitation par une lampe à vapeur de mercure) équipé d'une caméra CCD refroidie HisIs 23 (Europixel, Italie) et d'un "shutter", pilotés par ordinateur.

L'acquisition des images est réalisée sur la même zone du capillaire tout au long de l'expérience, avec un temps d'exposition de 50 msec en employant un filtre à l'excitation à 530-560 nm et un filtre à l'émission à 575-645 nm.

20                   Après lavage du capillaire avec du tampon de lavage tel que décrit ci-dessus à l'exemple 5, le capillaire fonctionnalisé est rempli de tampon phosphate 0,1 M pH 8,5 et la fluorescence initiale à t=0 est lue.

25                   Une solution de mAb SP31-Alexa 647 à 2,62 µM est ensuite introduite dans le capillaire. Après 10 minutes le capillaire est lavé (tampon de lavage durant 2 minutes à un débit de 35 µl/min) puis rempli de tampon phosphate 0,1 M pH 8,5 et la mesure de la fluorescence après "quenching" est effectuée.

On introduit par la suite une solution de Substance P à 10 nmol/ml pendant 80 minutes. Après une première mesure à t=15 secondes, les mesures sont réalisées toutes les 5 minutes.

30                   Après lavage du capillaire (tampon de lavage puis tampon phosphate 0,1 M pH 8,5 pendant 2 minutes pour chacun à 35 µl/min), la phase solide est

régénérée par une nouvelle incubation de mAb SP31-Alexa 647. L'expérience est ainsi répétée 3 fois.

## **2) Résultats**

5 Les résultats obtenus lors de cette expérience sont représentés sur la figure 8 annexée sur laquelle la fluorescence (en unités arbitraires) est exprimée en fonction du temps (minutes).

10 Ces résultats montrent que l'extinction ("quench") de la fluorescence du tripode-Alexa 532 par le mAb SP 31-Alexa 647 (zone 1 de la courbe), l'augmentation de la fluorescence en présence de substance P. (zone 2 de la courbe) et l'étape de régénération par l'introduction de mAb SP 31-Alexa 647 (zone 3 de la courbe) restent effectifs sur support solide tel que les capillaires et avec d'autres groupements luminescents (L) et accepteurs (Q) que ceux utilisés dans l'exemple 5.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'un analyte a dans un échantillon fluide, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

5 1) la saturation d'un support solide comportant, sur au moins une partie de sa surface, au moins un réactif trifonctionnel (tripode Y) comportant les trois pôles fonctionnels suivant :

i) un groupement luminescent (L),

ii) une molécule (B) choisie parmi l'analyte a, un analogue de l'analyte a ou un fragment de l'analyte a; et

10 iii) une fonction assurant la fixation dudit réactif trifonctionnel sur la surface dudit support solide ;

par un récepteur de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé accepteur (Q) (récepteur-Q) de la luminescence du groupement L, pour former un complexe C entre ladite molécule (B) et ledit récepteur-Q ;

15 2) la mise en contact du support solide obtenu à l'étape 1) avec un échantillon fluide susceptible de renfermer l'analyte a à détecter ;

3) la mesure de l'intensité du signal émis par le groupement L qui est proportionnelle à la quantité d'analyte a présent au sein de l'échantillon fluide ; et

20 4) la régénération du support solide par mise en contact dudit support solide avec du récepteur-Q.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que plusieurs types tripodes Y, différant les uns des autres par la nature de la molécule (B) qu'ils comprennent, sont fixés sur des zones distinctes et connues du support solide.

25 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que les étapes 3) et 4) sont réalisées en continu.

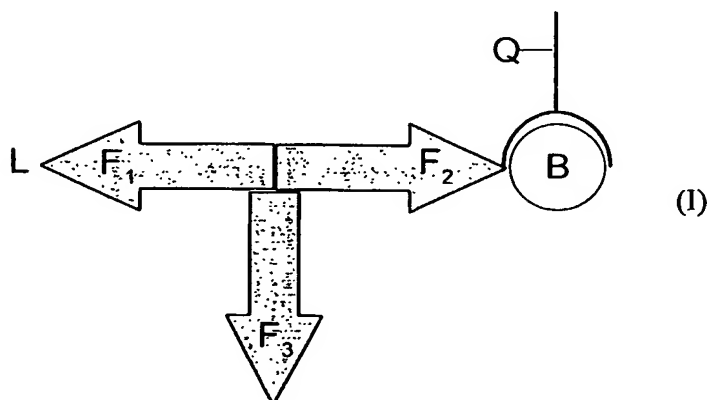
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le support solide est choisi parmi les verres, les plastiques, les céramiques, les métaux et les métalloïdes.

30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le support se présente sous la forme de tube, de capillaire, de plaque ou de bille.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'échantillon fluide est constitué par de l'eau, un milieu biologique liquide ou un milieu liquide contenant des molécules gazeuses dissoutes ou provenant d'échantillons solides.

5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'intensité du signal émis lors de l'étape 3) est effectuée par un détecteur de luminescence.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le complexe C formé à l'issue de l'étape 1) de saturation est  
10 choisi parmi les complexes de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- les flèches représentent la structure du squelette du tripode Y qui est un bras de liaison constitué par une chaîne peptidique, nucléotidique, glucosidique ou par une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ; lesdites  
15 chaînes étant éventuellement substituées, interrompues et/ou terminées par un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, O ou S et/ou par un ou plusieurs acides aminés, et comportant trois fonctions chimiques réactives  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  ;

- L représente un groupement luminescent lié de façon covalente au  
20 tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive  $F_1$  ;

- B représente un analyte a, un analogue structurel d'un analyte a ou un fragment d'un analyte a sur lequel est fixé, de façon non covalente et réversible, un récepteur spécifique de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé Q ; la

molécule (B) étant liée de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive  $F_2$  ;

- Q représente un composé accepteur de la luminescence du groupement L ;

5 -  $F_3$  représente une fonction chimique réactive apte à permettre la fixation du tripode Y sur la surface du support solide.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que les fonctions  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ , indépendamment l'une de l'autre, assurent :

10 i) soit une liaison directe *via* une fonction chimique correspondante présente sur le composé luminescent, la molécule (B) ou la phase solide ;

ii) soit une liaison indirecte, et dans ce cas, la liaison est réalisée en couplant à l'une au moins des fonctions  $F_1$ ,  $F_2$  et/ou  $F_3$ , une molécule  $M_1$  apte à former un complexe avec une molécule  $M_2$  préalablement fixée sur au moins une partie de la surface de la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le groupement luminescent.

15 10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé par le fait que les fonctions  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$ , identiques ou différentes, sont choisies parmi les fonctions thiols ; amines ; alcools ; acides ; esters ; isothiocyanates ; isocyanates ; acylazides ; chlorures de sulfonyl ; aldéhydes ; glyoxals ; époxydes ; oxiranes ; carbonates ; imidoesters ; carbodiimides ; maléimides ; nitriles, aziridines ; acryloyl ; les dérivés  
20 halogénés ; les groupements disulfides ; phosphorés ; diazo ; carbonyldiimidazole ; hydrazides ; arylazides ; hydrazines ; diazirines ; magnésiens ; lithiens ; cuprates ; zinciques et les systèmes insaturés.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que les fonctions  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  sont choisies parmi les fonctions amines de formule  $R-NH_2$ ,  
25  $R-NH-$ ,  $(R)_3-N$ ,  $R-NH-OR$  et  $NH_2-OR$  ; les fonctions alcool  $R-OH$  ; et les groupements halogénés de formule  $R-X$  avec X représentant un atome d'halogène ; étant entendu que dans lesdites formules R représente un radical alkyle, aryle, vinyle, ou allyle.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
30 caractérisé par le fait que les groupements luminescents sont choisis parmi la fluorescéine (fluorescéinate de sodium) et ses dérivés ; la rhodamine et ses dérivés ; le diaminidophényl indo (DAPI) ; l'acridine ; les colorants fluorescents à amines

réactives ; les colorants fluorescents vendus sous les dénominations commerciales BODIPY ® ; les colorants Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, DABCYL® et EDANS® ; l'Eosine ; l'Erythrosine, le 6-Fam et le Texas Red.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les récepteurs sont choisis parmi les anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante, les récepteurs biologiques, les acides nucléiques, les acides peptidonucléiques, les lectine, les protéines transporteuses, les chélates et les récepteurs synthétiques.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ledit récepteur présente une plus grande affinité pour l'analyte a que pour la molécule (B).

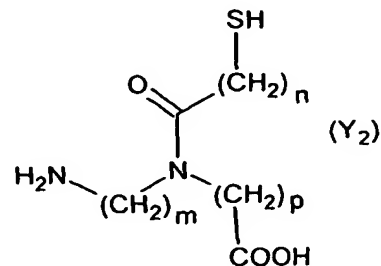
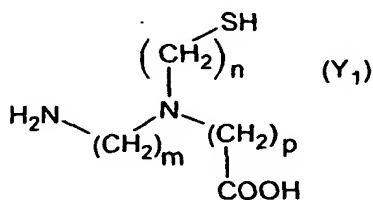
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le composé accepteur (Q) est choisi parmi la rhodamine et ses dérivés, les composés fluorescents cités à la revendication 12, des molécules non-fluorescentes choisies parmi les composés vendus sous les dénominations commerciales Black Hole Quencher ® 1, 2 et 3, Nanogold Particules ®, Eclipse Dark Quencher ®, Elle Quencher ®, le vert de malachite, et les colorants QSY ® 7, QSY ® 9 et QSY ® 21.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 15, caractérisé par le fait que les complexes de formule (I) sont choisis parmi les composés dans lesquels :

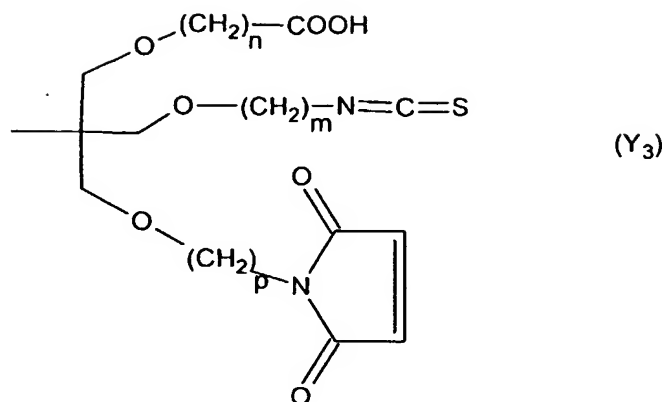
i) (B) est choisi parmi les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres et les acides peptidonucléiques,

ii) L est de la fluorescéine, et

iii) le squelette du tripode Y est choisi parmi les structures Y<sub>1</sub> à Y<sub>3</sub> suivantes :

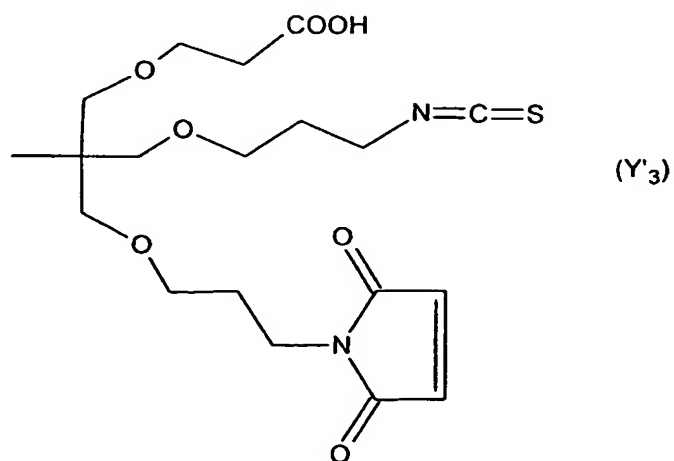
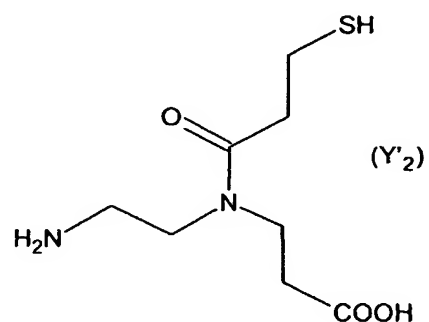
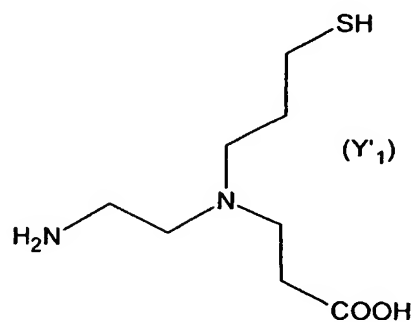




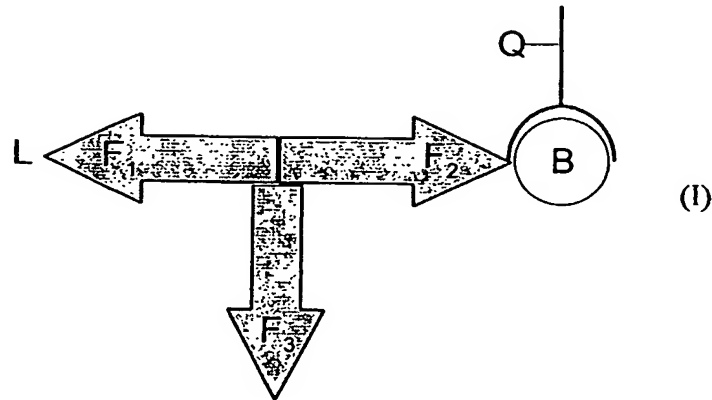


dans lesquelles  $n$ ,  $m$  et  $p$ , identiques ou différents, sont des nombres entiers compris entre 1 et 20 inclusivement.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que les structures  $Y_1$  à  $Y_3$  sont choisies parmi les composés de formules ( $Y'_1$ ) à ( $Y'_3$ ) suivantes :



18. Complexes C caractérisés par le fait qu'ils répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle L, B, Q, les flèches et  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  sont tels que définis à l'une quelconque des revendications 8 à 17.

19. Utilisation d'au moins un complexe C de formule (I) tel que défini à l'une quelconque des revendications 8 à 16, dans un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte a au sein d'un échantillon fluide.

20. Dispositif de détection en continu en phase hétérogène d'au moins un analyte a dans un échantillon fluide, ledit dispositif étant caractérisé par le fait qu'un échantillon fluide à analyser est intégré dans un milieu formant un flux s'écoulant sur au moins un support solide à la surface duquel est fixé au moins un tripode Y tel que défini à la revendication 1 et spécifique de l'analyte a à détecter, un détecteur de luminescence disposé en regard du support solide est couplé à une commande de vanne asservie à un seuil d'intensité de signal émis par le détecteur et qui déclenche, pendant une durée déterminée, l'ouverture d'un réservoir renfermant un récepteur-Q apte à former un complexe avec le tripode Y, ce réservoir étant relié au support par une boucle de rétroaction qui débouche en amont du support solide sur lequel est fixé le tripode Y, afin de saturer et/ou régénérer ce dernier en récepteur-Q par passage dans le flux et complexation sur le tripode Y.

21. Dispositif selon la revendication 20, dans lequel les valeurs de l'intensité de la luminescence sont monitorées et accessoirement traduites en quantité d'analyte a par un système de calcul couplé au détecteur de luminescence.

22. Dispositif selon la revendication 20 ou 21, dans lequel un marqueur d'évènement est disposé dans la boucle de rétroaction afin de signaler une variation de l'intensité du signal supérieure à une valeur prédéterminée.

23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 22,  
5 dans lequel le support solide est un capillaire couplé à l'environnement contenant l'échantillon à analyser, le couplage étant réalisé soit par l'intermédiaire d'un ballon de capture où l'échantillon barbote dans un milieu correspondant à celui du flux d'écoulement, soit par l'intermédiaire d'un conduit souple.

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 23,  
10 dans lequel le flux est entraîné par la dépression produite par une pompe, un piston, ou équivalent.

25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé par le fait qu'il est équipé d'un ballon de capture et d'un système de barbotage permettant de collecter des échantillons sous forme gazeuse et de solubiliser  
15 les constituants à détecter qu'ils renferment.

26. Utilisation d'un dispositif tel que défini à l'une quelconque des revendications 20 à 25, pour détecter la présence d'un analyte a dans un milieu naturel ou industriel.

27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisé par le fait que le  
20 dispositif est utilisé en lacs, rivières, piscines, usines, stations d'épuration, systèmes de ventilation ou de climatisation.

1/4

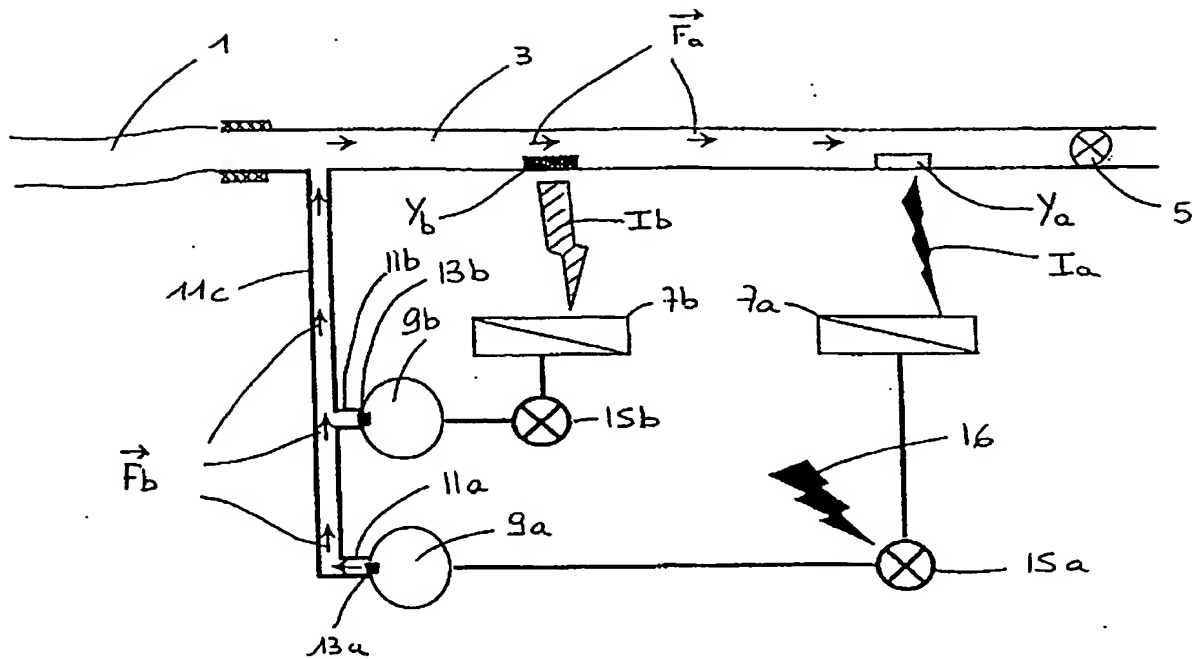


FIGURE 1

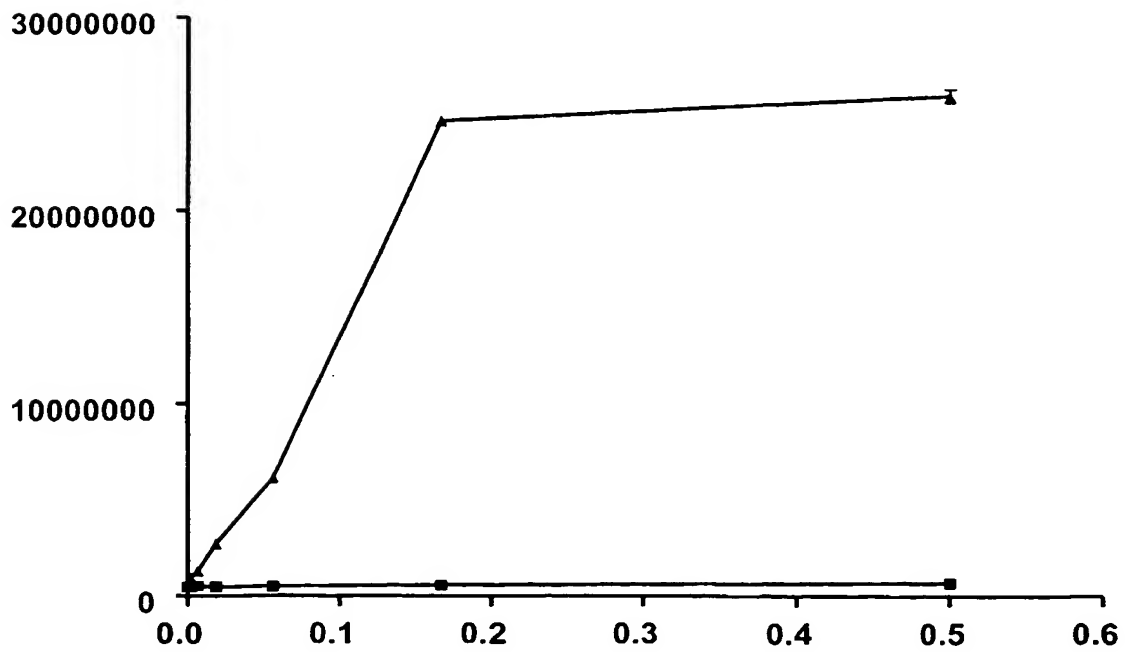
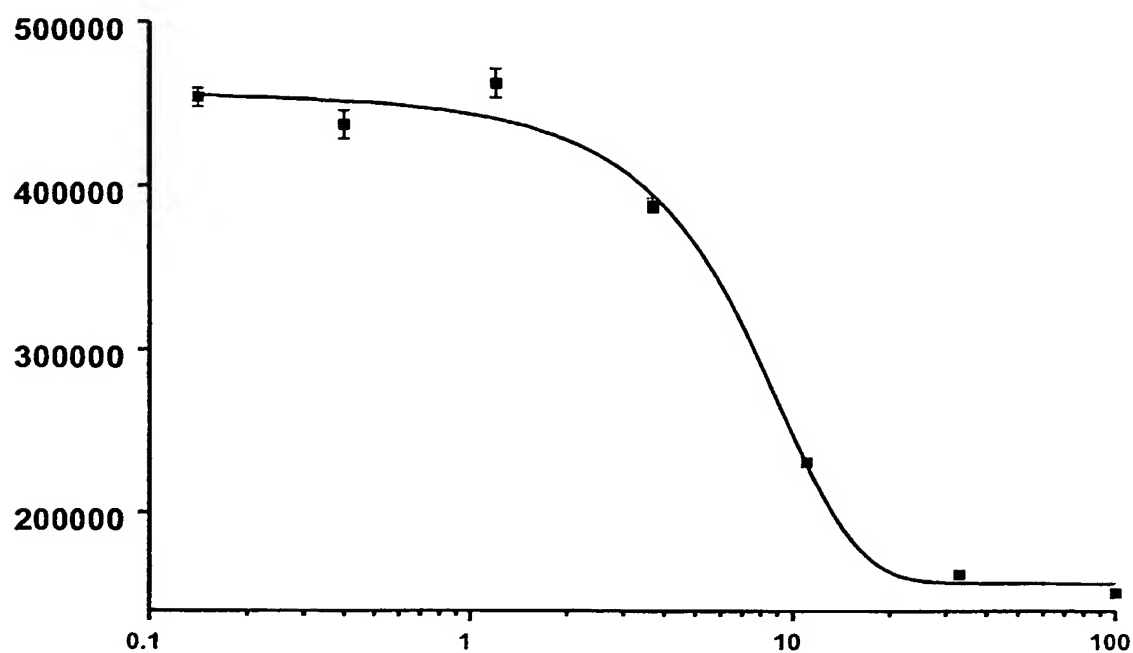
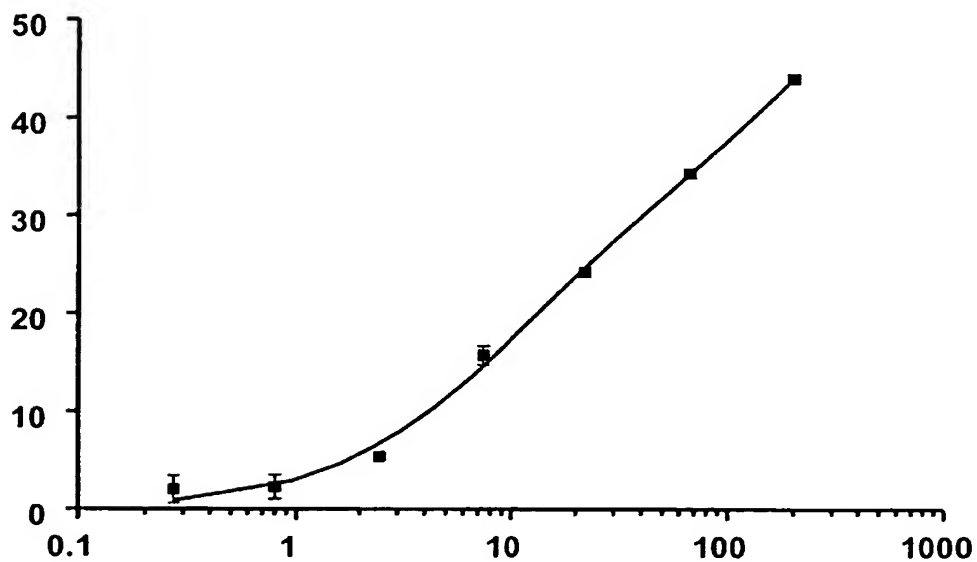


FIGURE 2

2/4

FIGURE 3FIGURE 4

3/4

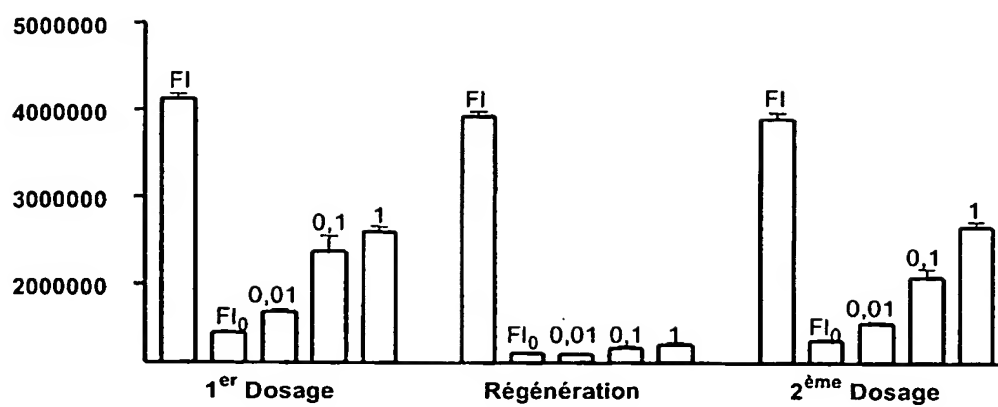


FIGURE 5

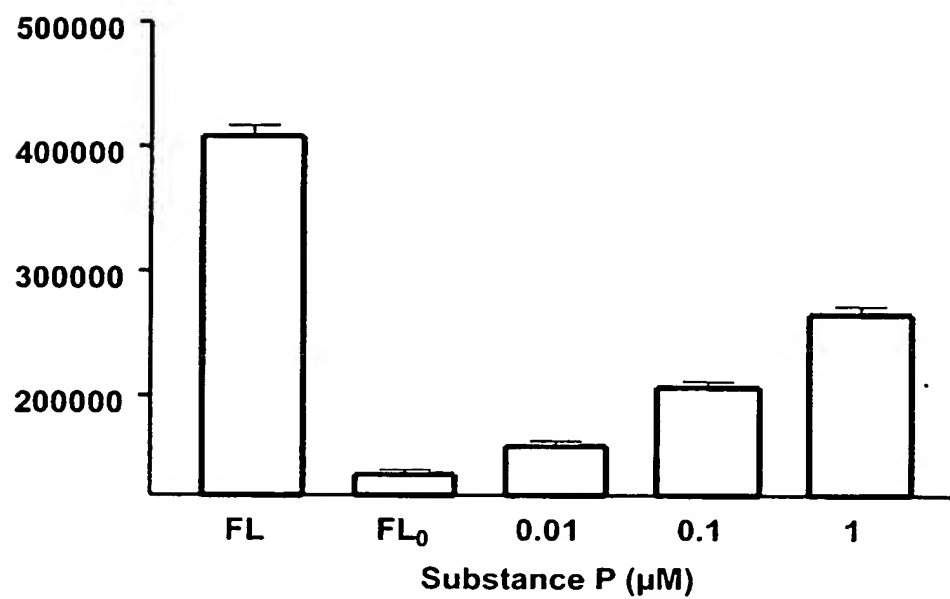


FIGURE 6

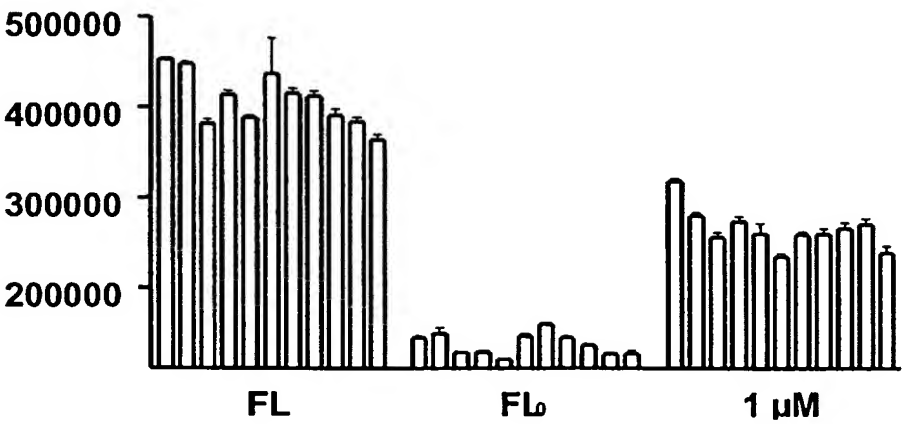


FIGURE 7

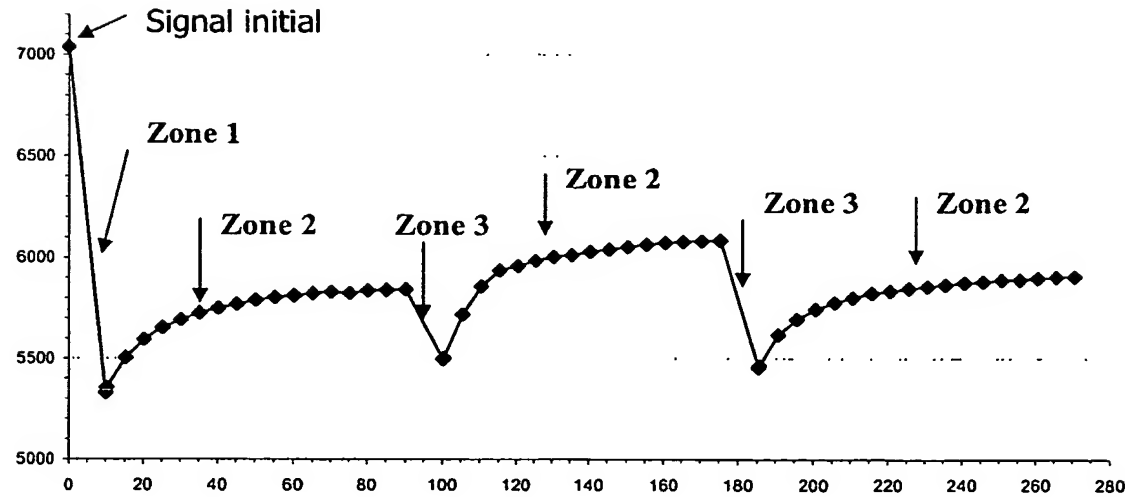


FIGURE 8

## SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> PROCEDE DE DETECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, REACTIF TRIFONCTIONNEL DE DETECTION MIS EN OEUVRE ET DISPOSITIF DE DETECTION

<130> F263PCT86

<150> FR0214959

<151> 2002-11-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> lysine biotinylée

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> biotinylated lysin

<400> 2

Lys Ser Ser Lys Arg Pro Ala Pro Gln Gln Phe Phe Gly Ala Met  
1 5 10 15



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PO 03/03521

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 183 740 A (KUSTERBECK ANNE W ET AL) 2 February 1993 (1993-02-02) cited in the application column 4, line 28 - line 42; claims 1,4	1-27
Y	US 5 519 142 A (HOESS EVA ET AL) 21 May 1996 (1996-05-21) column 1, line 40 - line 64	1-27
Y	EP 0 310 361 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 5 April 1989 (1989-04-05) page 2; claims 1,40	1-27
A	US 5 279 943 A (DAVIN THIERRY ET AL) 18 January 1994 (1994-01-18) cited in the application abstract	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 2004

Date of mailing of the international search report

14/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/03521

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5183740	A	02-02-1993	CA 2076748 A1	24-08-1991
			DE 69131274 D1	01-07-1999
			DE 69131274 T2	16-12-1999
			DK 517757 T3	15-11-1999
			EP 0517757 A1	16-12-1992
			JP 3149947 B2	26-03-2001
			JP 5504625 T	15-07-1993
			KR 171392 B1	15-05-1999
			WO 9113354 A1	05-09-1991
			US 6245296 B1	12-06-2001
US 5519142	A	21-05-1996	DE 4310141 A1	06-10-1994
			AT 171163 T	15-10-1998
			DE 59406903 D1	22-10-1998
			EP 0618192 A1	05-10-1994
			ES 2123677 T3	16-01-1999
			US 5601824 A	11-02-1997
EP 0310361	A	05-04-1989	AU 2605688 A	18-04-1989
			AU 623352 B2	14-05-1992
			EP 0310361 A2	05-04-1989
			JP 2627124 B2	02-07-1997
			JP 6222058 A	12-08-1994
			WO 8903041 A2	06-04-1989
			US 5661019 A	26-08-1997
			US 5168057 A	01-12-1992
			US 5851778 A	22-12-1998
US 5279943	A	18-01-1994	FR 2585836 A1	06-02-1987
			AT 64464 T	15-06-1991
			AU 595821 B2	12-04-1990
			AU 6147386 A	05-03-1987
			CA 1279260 C	22-01-1991
			DE 3679805 D1	18-07-1991
			EP 0232348 A1	19-08-1987
			ES 2000593 A6	01-03-1988
			WO 8700927 A1	12-02-1987
			IE 59302 B1	09-02-1994
			JP 7058291 B	21-06-1995
			JP 63500399 T	12-02-1988
			ZA 8605767 A	29-04-1987

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... internationale No  
PCT/FR 03/03521

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 183 740 A (KUSTERBECK ANNE W ET AL) 2 février 1993 (1993-02-02) cité dans la demande colonne 4, ligne 28 - ligne 42; revendications 1,4	1-27
Y	US 5 519 142 A (HOESS EVA ET AL) 21 mai 1996 (1996-05-21) colonne 1, ligne 40 - ligne 64	1-27
Y	EP 0 310 361 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 5 avril 1989 (1989-04-05) page 2; revendications 1,40	1-27
A	US 5 279 943 A (DAVIN THIERRY ET AL) 18 janvier 1994 (1994-01-18) cité dans la demande abrégé	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/04/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Dem. internationale No

PCT 03/03521

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5183740	A	02-02-1993	CA 2076748 A1	24-08-1991
			DE 69131274 D1	01-07-1999
			DE 69131274 T2	16-12-1999
			DK 517757 T3	15-11-1999
			EP 0517757 A1	16-12-1992
			JP 3149947 B2	26-03-2001
			JP 5504625 T	15-07-1993
			KR 171392 B1	15-05-1999
			WO 9113354 A1	05-09-1991
			US 6245296 B1	12-06-2001
US 5519142	A	21-05-1996	DE 4310141 A1	06-10-1994
			AT 171163 T	15-10-1998
			DE 59406903 D1	22-10-1998
			EP 0618192 A1	05-10-1994
			ES 2123677 T3	16-01-1999
			US 5601824 A	11-02-1997
EP 0310361	A	05-04-1989	AU 2605688 A	18-04-1989
			AU 623352 B2	14-05-1992
			EP 0310361 A2	05-04-1989
			JP 2627124 B2	02-07-1997
			JP 6222058 A	12-08-1994
			WO 8903041 A2	06-04-1989
			US 5661019 A	26-08-1997
			US 5168057 A	01-12-1992
			US 5851778 A	22-12-1998
US 5279943	A	18-01-1994	FR 2585836 A1	06-02-1987
			AT 64464 T	15-06-1991
			AU 595821 B2	12-04-1990
			AU 6147386 A	05-03-1987
			CA 1279260 C	22-01-1991
			DE 3679805 D1	18-07-1991
			EP 0232348 A1	19-08-1987
			ES 2000593 A6	01-03-1988
			WO 8700927 A1	12-02-1987
			IE 59302 B1	09-02-1994
			JP 7058291 B	21-06-1995
			JP 63500399 T	12-02-1988
			ZA 8605767 A	29-04-1987